



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1008760-5 B1



(22) Data do Depósito: 26/02/2010

(45) Data de Concessão: 10/12/2019

(54) Título: MÉTODO DE ENSAIO E KIT PARA UM ANALITO EM UMA AMOSTRA E SISTEMA PARA REALIZAR O MÉTODO DE ENSAIO

(51) Int.Cl.: C12Q 1/28; G01N 33/542; G01N 33/58.

(30) Prioridade Unionista: 01/02/2010 US 61/300,318; 27/02/2009 US 61/156,473.

(73) Titular(es): BECKMAN COULTER, INC..

(72) Inventor(es): HASHEM AKHAVAN-TAFTI; DEAN BINGER; YING CHEN; RENUKA DE SILVA; TERRI MCLERNON; JAMES MENDOZA; BRUCE ODEGAARD; MICHAEL SALVATI; NIR SHAPIR; WENHUA XIE.

(86) Pedido PCT: PCT US2010025657 de 26/02/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/099486 de 02/09/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 29/08/2011

(57) Resumo: MÉTODO DE ENSAIO E KIT PARA UM ANALITO EM UMA AMOSTRA E SISTEMA PARA REALIZAR O MÉTODO DE ENSAIO A presente invenção refere-se a métodos, reagentes, kits e sistemas que são descritos para determinar um analito em uma amostra suspeita de conter o analito onde todos os reagentes são solúveis em solução aquosa. Um método de ensaio inclui tratar uma amostra suspeita de conter o analito sob condições tais que se o analito estiver presente, um ativador é posto na configuração reativa com um composto quimioluminescente para ativá-lo. A amostra é também tratada com um agente para reduzir o sinal não relacionado com o analito. Finalmente, a amostra é tratada com uma solução ativadora, desse modo produzindo luz do composto quimioluminescente ativado. Nenhum reagente está associado com uma superfície ou outra fase sólida.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"MÉTODO DE ENSAIO E KIT PARA UM ANALITO EM UMA
AMOSTRA E SISTEMA PARA REALIZAR O MÉTODO DE ENSAIO".**

ANTECEDENTES

[0001] Ensaio de ligação específicos são métodos de teste para detectar presença e quantidade de uma substância e são com base no reconhecimento específico e ligação junto de pares de ligação específicos. Os imunoenaios são um exemplo de um ensaio de ligação específico no qual um anticorpo se liga a um composto ou proteína particular. Neste exemplo um anticorpo é um membro de um membro de par de ligações específico. Os Ensaio de ligação de ácido nucleico são outro tipo no qual os filamentos de ácido nucleico complementares são o par de ligações específico. Os ensaios de ligação específicos constituem um amplo e crescente campo de tecnologia que permite a detecção exata de estados de doença, organismos infecciosos e fármacos de abuso. Muito trabalho foi devotado durante algumas décadas passadas para inventar ensaios e metodologias de ensaio tendo a sensibilidade, faixa dinâmica, robustez, ampla aplicabilidade e adequação para automação requerida. Estes métodos podem ser agrupados amplamente em duas categorias.

[0002] Os métodos homogêneos utilizam uma reação de ligação específica de analitos para modular ou criar um sinal detectável sem requerer uma etapa de separação entre reagentes não específicos de analito e específicos de analito. Os formatos heterogêneos dependem da separação física de pares de ligação específicos detectavelmente rotulados livres (não ligados ao analito) e ligado ao analito. A separação tipicamente requer que reagentes críticos sejam imobilizados sobre algum tipo de substrato sólido de modo que algum tipo de processo físico possa ser empregado, por exemplo, filtração,

sedimentação, aglomeração ou separação magnético, e tipicamente também requer etapas de lavagem para remover os pares de ligação específicos detectavelmente rotulados livres.

[0003] Os métodos de ensaio dependem da produção de um sinal quimioluminescente e estão relacionados com a quantidade de um analito que experimentou o uso crescente. Tais métodos podem ser realizados com instrumentos relativamente simples, porém, exibindo boas características analíticas. Em particular, os métodos empregando um par de ligações específico rotulado por enzima para o analito e um substrato de enzima quimioluminescente para a detecção encontraram uso generalizado. As enzimas de rótulo comuns incluem alcalina fosfatase e rábano picante pero-xidase.

[0004] A Patente dos Estados Unidos 6.911.305 descreve um método para detectar analitos de polinucleotídeo ligados a uma sonda rotulada por sensibilizador ou sensibilizador em uma primeira película. A película é contatada com uma segunda película transportando um precursor quimioluminescente imobilizado. A excitação do sensibilizador nas películas sanduíche produz oxigênio singleto que reage com o precursor quimioluminescente para produzir um composto quimioluminescente ativável sobre a segunda película. O composto quimioluminescente ativável é reagido com um reagente para gerar para erar quimioluminescência sobre a segunda película para detectar o analito. Estes métodos não dependem da reação de ligação específica para trazer os reagentes em contato; de preferência a segunda película serve como um dispositivo de liberação de reagente.

[0005] A Patente dos Estados Unidos 6.406.913 descreve métodos de ensaio compreendendo tratar um meio suspeito de conter um analito em condições tais que o analito faça com que um composto quimioluminescente e fotossensibilizador entre em proximidade íntima. O fotossensibilizador gera oxigênio singleto quando irradiado com uma

fonte de luz; o oxigênio singlete difunde através de uma solução e ativa o composto quimioluminescente quando está em proximidade íntima. O composto quimioluminescente ativado subseqüentemente produz luz. A quantidade de luz produzida está relacionada com a quantidade de analito no meio. Em uma modalidade, pelo menos um dos compostos fotossensibilizador ou quimioluminescente está associado com uma partícula capaz de tornar-se suspensa, e um membro de par de ligações específico é ligado a isto.

[0006] As publicações do pedido de Patente dos Estados Unidos US20070264664 e US20070264665 descrevem metodologia de ensaio para realizar ensaios específicos de par de ligações envolvendo a reação de compostos quimioluminescentes imobilizados com compostos ativadores colocados em uma configuração reativa m virtude da reação de ligação específica. Nenhuma separação ou remoção do ativador ou composto quimioluminescente não ligado em excesso é requerida. Estes formatos de ensaio fornecem flexibilidade e conveniência operacional superiores em automação comparados com as técnicas de ensaio da técnica anterior. A despeito destas vantagens, melhoras adicionais no desempenho e desígnio do ensaio continuam como um objetivo dos desenvolvedores do ensaio. Os métodos do ensaio da presente descrição direciona estas necessidades fornecendo-se métodos de ensaio simples de sensibilidade melhorada.

SUMÁRIO

[0007] Métodos, reagentes, *kits*, e sistemas são descritos para determinar um analito em uma amostra suspeita de conter o analito onde todos os reagentes são solúveis em solução aquosa. Um método de ensaio inclui tratar uma amostra suspeita de conter o analito sob condições tais que se o analito estiver presente, um ativador será trazido para configuração reativa com um composto

quimioluminescente para ativá-lo. A amostra é também tratada com um agente para reduzir o sinal não relacionado com o analito. Finalmente, a amostra é tratada com uma solução ativadora por meio da qual produzindo luz do composto quimioluminescente ativado. Nenhum reagente está associado com uma superfície ou outra fase sólida.

DESCRIÇÃO

Definições

[0008] Grupo hidrocarboneto cíclico ou de cadeia linear, ramificada de alquila--A contendo de 1-20 carbonos que podem ser substituídos com 1 ou mais substituintes exceto H. Alquila inferior como utilizada aqui refere-se àqueles grupos alquila contendo até 8 carbonos.

[0009] A substância de analito--A é uma amostra a ser detectada em um ensaio. Uma ou mais substâncias tendo uma afinidade de ligação específica com o analito será utilizada para detectar o analito. O analito pode ser uma proteína, um peptídeo, um anticorpo, ou um hapteno para que um anticorpo que o liga possa ser feito. O analito pode ser um ácido nucleico ou oligonucleotídeo que é ligado por um ácido nucleico ou oligonucleotídeo complementar. O analito pode ser qualquer outra substância que forme um membro de um par de ligações específico. Outros tipos exemplares de analitos incluem fármacos tais como esteroides, hormônios, proteínas, glicoproteínas, mucoproteínas, nucleoproteínas, fosfoproteínas, fármacos de abuso, vitaminas, antibactericidas, antifúngicos, antivirais, purinas, agentes antineoplásicos, anfetaminas, compostos de azepina, nucleotídeos, e prostaglandinas, bem como metabólitos de quaisquer destes fármacos, pesticidas e metabólitos de pesticidas, e receptores. O analito também inclui células, vírus, bactérias e fungos.

[00010] Ativador: um composto, também pode ser referido como um rótulo, que afeta a ativação do composto quimioluminescente de modo

que, na presença de um ativador, quimioluminescência seja produzida.

[00011] O conjugado de membro de ligação específico de ativador ou sbm rotulado por ativador – um reagente na mistura de ensaio que inclui pelo menos o seguinte em uma configuração conectada: a) um membro de ligação específico para um analito e b) um rótulo ou composto ativador que efetue a ativação de um composto quimioluminescente.

[00012] Anticorpo -- inclui a imunoglobulina total bem como fragmentos nativos e construídos.

[00013] Aralquila – Um grupo alquila substituído com um grupo arila. Os exemplos incluem benzila, benzidril, tritila e feniletila.

[00014] Arila – Um grupo contendo anel aromático contendo 1 a 5 anéis aromáticos carbocíclicos, que podem ser substituídos com 1 ou mais substituintes exceto H.

[00015] Material biológico -- inclui, por exemplo, sangue total, sangue total anticoagulado, plasma, soro, tecido, células de animal e planta, teor celular, vírus, e fungos.

[00016] Composto quimioluminescente – Um composto, que também pode ser referido como um rótulo, que passa por uma reação para causar a emissão de luz, por exemplo, sendo convertido em outro composto formado em um estado eletronicamente excitado. O estado excitado pode ser um estado excitado singleto ou tripleto. O estado excitado pode diretamente emitir luz sob relaxamento do estado de base ou pode transferir energia de excitação para um receptor de energia emissivo, desse modo retornando para o estado de base. O receptor de energia é elevado para um estado excitado no processo e emite luz.

[00017] sbm imóvel rotulado por quimioluminescente: um reagente na mistura de ensaio que inclui pelo menos o seguinte em uma configuração conectada: a) um membro de ligação específico para um

analito, b) um rótulo ou composto quimioluminescente, e c) uma fase sólida.

[00018] Conectado - Como utilizado aqui indica que duas ou mais espécies químicas ou materiais de suporte estão quimicamente ligados, por exemplo, por uma ou mais ligações covalentes, ou são passivamente presas, por exemplo, por absorção, atração iônica, ou um processo de ligação específico tal como ligação por afinidade. Quando tais espécies ou materiais são conectados com cada outro, mais do que um tipo de conexão pode estar envolvido.

[00019] Resposta de dose – Sinal, tal como saída quimioluminescente de uma reação de ensaio que está relacionada com a quantidade do analito sendo determinada na amostra.

[00020] Heteroalquila – Um grupo alquila no qual pelo menos um dos anéis ou átomos de carbono de cadeia não terminal é substituído com um heteroátomo selecionado de N, O, ou S.

[00021] Heteroarila – Um grupo arila no qual um a três átomos de carbono de anel é substituído com um heteroátomo selecionado de N, O, ou S. Os grupos exemplares incluem grupos piridila, pirrolila, tienila, furila, quinolila e acridnila.

[00022] Mistura de amostra A contendo ou suspeito de conter um analito a ser medido em um ensaio. Analitos incluem, por exemplo, proteínas, peptídeos, ácido nucleicos, hormônios, anticorpos, fármacos, e esteróides. Amostras típicas que podem ser utilizadas nos métodos da descrição incluem fluidos corporais tais como sangue, que podem ser sangue anticoagulado como é geralmente encontrado em espécimes de sangue coletado, plasma, soro, urina, sémen, saliva, culturas de célula, extratos de tecido e similares. Outros tipos de amostras incluem solventes, água do mar, amostras de água industrial e amostras ambientais tais como solo ou água, materiais de planta, eucariotas, bactérias, plasmídeos, vírus, fungos, e células originadas

de procariotas.

[00023] sbp -- Um membro de par de ligações específico ou par de ligações específico é uma molécula, incluindo moléculas biológicas, tendo uma afinidade de ligação específica para outra substância (por exemplo, analito. Dois pares de ligação específicos para um analito, preferivelmente com sítios de ligação diferentes no analito, são referidos como um par de ligações específico.

[00024] SSIA, (Agente de Inibição de Sinal Seletivo)— Um composto fornecido em uma mistura de reação de ensaio da presente descrição tal que o sinal não específico ou sinal de base seja reduzido em uma quantidade maior do que o sinal específico de analito gerado da reação de produção de quimioluminescente da mistura de reação de ensaio.

[00025] Suporte Sólido – um material de pelo menos 1 micron em tamanho tendo uma superfície sob a qual os componentes de ensaio são imobilizados. Os materiais podem estar na forma de partículas, micropartículas, nanopartículas, colóides de metal, fibras, folhas, contas, membranas, filtros, e outros suportes tais como tubos de teste, microcavidades, fragmentos, lâminas de vidro, e microdisposições.

[00026] Solúvel, solubilidade, solubilizar – A capacidade ou tendência de uma substância se misturar uniformemente com outra. Na presente descrição, solubilidade e termos relacionados geralmente se referem à propriedade de um sólido em um líquido, por exemplo, SSIA em um tampão aquoso. Os sólidos são solúveis na medida em eles perdem sua forma cristalina e se tornam molecularmente ou ionicamente dissolvidos ou dispersos no solvente (por exemplo, líquido) para formar uma solução verdadeira. Em contraste: sistemas de duas fases onde uma fase consiste em pequenas partículas (incluindo micropartículas ou partículas de tamanho coloidal) distribuídas em toda uma substância volumosa, seja estabilizada para

deter a precipitação ou não estabilizada.

[00027] Substituído – Refere-se a substituição de pelo menos um átomo de hidrogênio em um grupo por um grupo não hidrogênio. Deve ser notado que em referência aos grupos substituídos é pretendido que múltiplos pontos de substituição possam estar presente a menos que claramente indicado de outro modo.

[00028] Recipiente de reação – Um recipiente ou aparato para conter a amostra e outros componentes de um ensaio de acordo com a presente invenção. Incluídos são, por exemplo, tubos de teste de vários tamanhos e formas, e placas de microcavidade.

Descrição

[00029] A presente descrição fornece métodos de ensaio homogêneo, em particular métodos de ensaio homogêneo utilizando detecção quimioluminescente de analitos após ligação de um par de ligações específico rotulado por quimioluminescente e um conjugado de par de ligações específico rotulado por ativador e o analito. Os métodos e ensaios homogêneos são realizados sem separar pares de ligação específicos livres de pares de ligação específicos ligados em complexos.

[00030] A presente descrição fornece ensaios homogêneos rápidos e simples para detectar a presença, local, ou quantidade de substâncias por meios de reações de par de ligações específico. Os ensaios requerem o uso de um composto quimioluminescente conectado com um primeiro par de ligações específico ("sbp rotulado por quimioluminescente"), um composto ativador conjugado para um segundo par de ligações específico ("sbp rotulado por ativador"), um agente de inibição de sinal seletivo ("SSIA"), um realçador, em uma fase se solução e uma solução ativadora.

[00031] Em contraste com outros ensaios homogêneos, uma modalidade básica desta descrição, todos os reagentes, incluindo o

sbp rotulado por ativador e o sbp rotulado por quimioluminescente são solúveis em solução aquosa. Na realidade, os ensaios da presente descrição não requerem ou utilizam uma fase sólida. Os métodos de ensaio presentes também diferem de outros métodos de ensaio homogêneo por não requererem construções especializadas, isto é membro de pares de ligações específicos rotulados que são designados com um componente detectável que é inativo ou somente capaz de gerar o sinal detectável particular após ser ligado em um complexo com outro componente. Em contraste com o sistema de ensaio da presente descrição, outros sistemas de ensaio homogêneo são complexos, difíceis ou caros para preparar por que eles requerem tais componentes especializados. Os presentes ensaios proporcionam metodologias mais simples, mais flexíveis para desenvolvimento e desígnio de ensaio e permitem aplicação mais pronta a uma ampla variedade de analitos. Os presentes métodos de ensaio diferem de métodos de ensaio com base em separação ou heterogêneos convencionais por não utilizarem uma etapa de separação ou processo para diferenciar pares de ligação específicos livres de pares de ligação específicos ligados em complexos. Por uso dos presentes métodos de ensaio que evitam separações, a condução de ensaios é simplificada, os tempos do ensaio podem ser reduzidos e a automação é facilitada.

[00032] Nos métodos de ensaio da presente descrição um sbp rotulado por quimioluminescente um sbp rotulado por ativador, e agente de inibição de sinal seletivo ("SSIA"), são levados juntos em solução aquosa com uma amostra. Em uma modalidade quando o analito reconhecido pelos membros de sbp está presente na amostra, o sbp rotulado por quimioluminescente e sbp rotulado por ativador cada se liga a áreas diferentes do analito. O sinal específico relacionado com o analito é gerado e a detecção começa sob adição

de uma solução ativadora. Em outra modalidade um análogo rotulado por quimioluminescente do analito é fornecido para uso em um formato de ensaio competitivo. O analito e análogo rotulado por quimioluminescente competitivamente se liga ao sbp rotulado por ativador. Os complexos de análogo rotulado por quimioluminescente e sbp rotulado por ativador podem ser pré-formados e o analito adicionado para deslocar o análogo rotulado em uma modalidade de um ensaio de ligação competitivo. Em outra modalidade o análogo rotulado por quimioluminescente, o analito, e sbp rotulado por ativador podem ser misturados juntos sem pré-formação de complexos de ligação. O sinal específico relacionado com o analito é gerado e a detecção começa sob adição de uma solução ativadora. O sinal é inversamente relacionado com a concentração de analito neste formato d ensaio.

[00033] Como um resultado dos pares de ligações específicos ligando-se ao analito, um ativador é levado em proximidade operável a um composto quimioluminescente de modo que seja eficaz ativar uma reação gerando quimiluminescência sob adição de uma solução ativadora. A reação do ativador com o composto quimioluminescente ativa ou altera o composto quimioluminescente tal que o tratamento com uma solução ativadora resulte em uma reação adicional resultando na geração de luz. Por proximidade operável é entendido que o composto quimioluminescente e ativador estejam próximos o suficiente, incluindo e até o contato físico, de forma que eles possam reagir. Quantidades em excesso de par de ligações específico rotulado por ativador e/ou par de ligações específico rotulado por quimioluminescente podem ser fornecidas ao sistema em relação à quantidade necessária para determinar a concentração de analito. O sbp rotulado por ativador não ligado em excesso e/ou conjugado de quimioluminescente não ligado não é removido antes da adição da

solução ativadora e detecção uma vez que sua presença e a falta de fase sólida no sistema de ensaio não previnem o sinal de detecção quimioluminescente de ser precisamente correlacionado com a quantidade do analito. Uma vez que os pares de ligações específicos não ligados, rotulados são capazes de sofrer a mesma reação de detecção quimioluminescente e os reagentes não são conectados a uma fase sólida, nenhuma correlação útil, ou na melhor das hipóteses, uma correlação muito limitada de sinal com o analito seria esperada. Esse recurso seria, de acordo com a sabedoria convencional, ordinariamente a causa para que os ensaios falhem.

[00034] Surpreendentemente, este problema foi superado pelo uso de um agente de inibição de sinal seletivo nos métodos presentes. Nos presentes métodos, os reagentes estando na solução com nenhuma conexão com a fase sólida e presença de ativador em excesso e/ou composto quimioluminescente em excesso, que não é removido, não anula a capacidade de realizar ensaios de ligação dependentes de concentração de analito sensíveis, específicas. Esta descoberta não era esperada ou prevista. Em particular quando o ativador é um catalisador tal como uma enzima que ordinariamente induziria centenas de milhares de transformações reativas a cada segundo quando a molécula na qual ele reage está livre na solução, não teria sido esperado que o ativador ligado pudesse ser utilmente discriminado da reação de ativador livre para produzir um sinal de resposta de dose sobre uma ampla faixa de concentrações de analito. Ainda os inventores descobriram que discriminação excelente resulta da adição de certos compostos de SSIA. Pelo uso do SSIA, a relação de sinal produzido por reação entre rótulo quimioluminescente e rótulo ativador, ambos em uma configuração reativa por modo de um complexo de membros de par de ligações específicos rotulados com um analito, para sinal dos rótulos presentes, porém, não em tal

complexo é dramaticamente melhorada.

[00035] A função do SSIA na melhora de sensibilidade de ensaio é entendida e, referência ao Esquema 1. Múltiplas combinações diferentes de sbp rotulado por quimioluminescente livre (por exemplo, não ligado ao analito) e complexo (por exemplo, analito ligado) ("CLSBP") e par de ligações específico rotulado por ativador ("ALSBP") pode possivelmente contribuir com o sinal de quimioluminescente observado quando a solução ativadora é adicionada. Quatro esquemas de reação propostos são listados abaixo:

- 1 Ligado-ALSBP + Ligado-CLSBP → Sinal Específico
- 2 Ligado- ALSBP + Livre- CLSBP → Sinal Não Específico
- 3 Livre- ALSBP + Ligado- CLSBP → Sinal Não Específico
- 4 Livre- ALSBP + Livre- CLSBP → Sinal Não Específico

[00036] Como mostrado na lista acima, quatro diferentes tipos de pares de quimioluminescente-ativador podem reagir na mistura de reação; ainda somente o primeiro tipo produz um sinal que é relatável pela quantidade de analito em um ensaio. O SSIA alcança sua função surpreendente seletivamente inibindo-se ou deprimindo-se a quantidade de sinal das reações 2-4 em relação àquela da reação 1. Em algumas modalidades isto pode ocorrer reduzindo-se todas as quatro reações, porém, reduzindo-se o sinal de 2-4 proporcionalmente muito mais.

[00037] Em modalidades da presente invenção, há métodos fornecidos de ensaio de analitos de interesse em uma amostra por meios de reações de ligação específicas envolvendo o analito e pares de ligações específicas (sbp) para o analito onde um par de ligações específico é rotulado com um composto ativador que pode ser um catalisador tal como uma enzima, particularmente uma enzima peroxidase. Outro par de ligações específico para o analito é rotulado

com um composto quimioluminescente. A ligação dos sbp's rotulados e o analito formam complexos rotulados. O composto quimioluminescente sofre uma reação quimioluminescente induzida pelo ativador quando uma solução ativadora é adicionada. A quimioluminescência que resulta está relacionada com a quantidade do analito na amostra. As reações de par de ligações específico e a reação de quimioluminescente são realizadas com todos os componentes dissolvidos em uma solução, tipicamente uma solução aquosa. Significativamente, os pares de ligações específicos rotulados são fornecidos em uma quantidade de excesso em relação a quantidade do analito na amostra de modo que nem todo o sbp rotulado forme complexos com o analito. Os sbp's rotulados em excesso não são removidos da solução de reação embora eles sejam capazes de participar na reação de quimioluminescente. A reatividade de sbp's rotulados que não estão em complexos e não são removidos ordinariamente previne tais ensaios homogêneos de serem realizados uma vez que sinais inaceitavelmente elevados são gerados o que não é devido à presença de formação de complexo mediada pelo analito. Em muitos casos tanto sinal de "base" é gerado que nenhuma relação de dose-resposta útil pode ser provocada. Para ser capaz de realizar um ensaio de não separação homogêneo quando todos os componentes da reação para geração de sinal quimioluminescente estão presentes tanto no complexo de ligação quanto na forma livre ou não ligada, alguns meios devem ser fornecidos para discriminar os sbp's rotulados ligados e não ligados, exceto uma separação física. A presente invenção fornece uma solução procurada por muito tempo para este problema e fornece métodos de ensaio onde todos os componentes estão na solução, nenhuma separação é realizada. Diferente dos métodos de ensaio homogêneo conhecidos, os presentes métodos não requerem ou usam pares de ligação rotulados

especialmente designados que sejam incapazes de sofrer a reação de produção de sinal a menos que eles sejam levados a um complexo de ligação.

[00038] Nos métodos de ensaio incorporados pela invenção, a discriminação necessária de membros de sbp rotulados ligados em um complexo com o analito de membros de sbp rotulados livres, não ligados é obtida fornecendo-se um Agente de Inibição de Sinal Seletivo (SSIA) para a solução de reação. A adição de uma quantidade eficaz do SSIA à solução de reação faz com que o sinal dos membros de sbp rotulados ligados (Sinal) exceda o sinal de base, incluindo qualquer contribuição de sinal de membros de sbp rotulados não ligados por um grau significativamente maior do que ocorre em sua ausência. Quando esta melhora da relação de Sinal para Base é obtida, a utilidade dos ensaios aumenta, incluindo níveis mais elevados de sensibilidade de detecção.

[00039] Em uma modalidade nesse aspecto são fornecidos métodos de ensaio, em particular métodos de ensaio de ligação, nos quais um sbp rotulado por quimioluminescente e um sbp rotulado por ativador são levados a uma proximidade operável através de pelo menos uma reação de ligação específica devido à presença de um analito, sendo que o sbp rotulado por ativador ligado ativa uma reação gerando quimioluminescência sob adição de uma solução ativadora para detectar a presença, local ou quantidade do analito.

[00040] Em uma modalidade, os presentes métodos também diferem de métodos de teste convencionais em não remover o sbp rotulado por ativador não ligado presente em grande excesso para a quantidade especificamente conectada com o analito. Nenhuma lavagem ou separação de sbp rotulado por ativador de ativador não ligado em excesso é requerida. Em outra modalidade os presentes métodos também não removem o conjugado quimioluminescente não

ligado presente em excesso para a quantidade especificamente conectada com o analito. Nenhuma lavagem ou separação de conjugado quimioluminescente não ligado em excesso é requerida.

[00041] Os componentes de ensaio, isto é: amostra contendo analito, sbp rotulado por ativador, sbp rotulado por quimioluminescente, agente de inibição de sinal seletivo e solução ativadora pode ser adicionada sequencialmente a um vaso de teste, sem lavagem ou separações, e leitura de luminescência. Os componentes de ensaio, exceto a solução ativadora que é adicionada por ultimo, podem ser adicionados em qualquer ordem ou combinação ao vaso de teste. Em uma modalidade, a amostra e sbp rotulado por ativador podem ser pré-misturados e adicionados ao vaso de teste contendo o sbp rotulado por quimioluminescente antes de introduzir a solução ativadora.

[00042] Os ensaios convencionais utilizando substratos quimioluminescentes e conjugados rotulados por enzima fornecem o substrato quimioluminescente em grande excesso para a quantidade de enzima de rótulo. Frequentemente, a relação molar de substrato/enzima pode exceder nove forças de dez, isto é, bilhões de vezes em excesso. Acredita-se que seja necessário em ensaios convencionais fornecer tal excesso enorme de composto quimioluminescente para garantir um fornecimento adequado de substrato para reposição enzimática contínua e que este processo garante sensibilidade de detecção adequada em métodos de ensaio. Os requerentes descobriram que é possível inventar métodos de ensaio altamente sensíveis que reduzem a relação de composto quimioluminescente para ativador por várias ordens de magnitude. Neste respeito, estes métodos descritos aqui diferem fundamentalmente de conhecidos métodos de ensaio ligados à enzima.

[00043] A eliminação de etapas de lavagem e separação como descrito acima e como demonstrado em ensaios exemplares descritos abaixo proporciona oportunidades para simplificar o desígnio de protocolos de ensaio. O número reduzido de etapas operacionais diminui o tempo do ensaio, variabilidade interensaio de lavagem incompleta, e custo. Ao mesmo tempo realça a capacidade de automatizar e miniaturizar o desempenho do ensaio com todas as vantagens inerentes em automação e miniaturização.

[00044] Os ensaios realizados de acordo com os presentes métodos incluem fornecer um par de ligações específico ("sbp") para especificamente ligar ou capturar um analito de interesse. O par de ligações específico é capaz de diretamente ou indiretamente ligar um analito a ser detectado. O par de ligações específico é também fornecido com composto de rotulação quimioluminescente preso diretamente ou indiretamente a este. O rótulo quimioluminescente pode ser fornecido de vários modos diferentes como descrito em maiores detalhes abaixo. Em cada variante o rótulo quimioluminescente é estavelmente ou irreversivelmente conectado, diretamente ou indiretamente com o par de ligações específico de um modo que mantenha a solubilidade aquosa do "sbp rotulado por quimioluminescente". Por "irreversivelmente" é pretendido que o rótulo quimioluminescente não seja substancialmente removido do sbp rotulado por quimioluminescente sob as condições de uso do ensaio pretendido. A ligação passiva ou não covalente é também contemplada desde que o rótulo seja estavelmente preso e retido sobre o sbp rotulado por quimioluminescente sob as condições de use.

[00045] O ensaio também inclui fornecer um sbp rotulado por ativador tendo o analito e o par de ligações específico conectado ao sbp rotulado por quimioluminescente para o analito e permitir que os componentes formem complexos de ligação específicos. A amostra,

sbp rotulado por quimioluminescente, e ativador sbp rotulado por ativador podem ser adicionados separadamente em qualquer ordem ou em qualquer combinação sequencialmente ou simultaneamente, ou podem ser pré-misturados e adicionados como uma combinação. Tipicamente um período de tempo será requerido para permitir a ligação do analito aos membros de sbp rotulados. Isto pode ser realizado em algumas modalidades onde os componentes de ligação são adicionados sequencialmente por um tempo de atraso opcional para permitir que as reações de ligação ocorram.

[00046] Após o complexo de ligação ser formado, uma solução ativadora é adicionada para produzir a quimioluminescência para detectar o analito e a quimioluminescência é detectada. Tipicamente o nível de intensidade de luz máximo, ou intensidade de luz é integrado durante um intervalo de tempo fixo, ou a intensidade de luz integrada total é medida. A quantidade de luz produzida está relacionada com a quantidade do analito presente na amostra contida em um vaso de reação. A quantidade de luz pode ser utilizada para determinar a quantidade numérica do analito construindo-se uma curva de calibração de acordo com métodos geralmente conhecidos. Quando a emissão de luz segue rapidamente sob adição da solução ativadora é desejável mecanicamente determinar o tempo do início da medição pela adição por meios de um injetor adequado ou realizar a adição com o vaso de reação já exposto ao detector. Quantidades ideais de reagentes, volumes, diluições, tempos de incubação para reações de par de ligações específico, concentração de reagentes, etc., podem ser facilmente determinados por experimentação de rotina, por referência aos tratados padrões em método para realizar o ensaio de ligação específico e utilizar como um guia os exemplos específicos descritos em detalhes abaixo.

[00047] A concentração ou a quantidade dos membros e sbp

utilizados nos presentes métodos e ensaios dependerão de tais fatores como concentração de analito, a velocidade desejada do tempo de ligação/ensaio, custo e disponibilidade dos conjugados, o grau de ligação não específica de membros de sbp. Geralmente, os membros de sbp estarão presentes em concentração de analito antecipado pelo menos igual a mínima, mais geralmente pelo menos a concentração de analito superior esperada ou maior, e para ensaios não competitivos as concentrações podem ser de 10 vezes a 10^6 vezes a concentração de analito superior. Geralmente a concentração de membros de sbp é menor do que 10^{-4} M, preferivelmente menor do que 10^{-6} M, frequentemente entre 10^{-11} e 10^{-7} M. A quantidade de ativador ou composto quimioluminescente conectado com um membro de geralmente será pelo menos uma molécula por membro de sbp e pode ser tão elevado quanto 10^2 , e mais. Em muitas modalidades, uma quantidade de ativador ou composto quimioluminescente conectado com um membro de sbp é de 1 a 20 moléculas. Os exemplos e outras relações de ativador para composto quimioluminescente são fornecidos nos exemplos trabalhados.

SBP ROTULADO POR QUIMIOLUMINESCENTE

[00048] Os métodos requerem o uso de um composto quimioluminescente conectado com um primeiro par de ligações específico ("sbp rotulado por quimioluminescente").

[00049] Nos ensaios e métodos da presente descrição, o sbp rotulado por quimioluminescente é solúvel em solução aquosa. Nos ensaios e métodos da presente descrição, o composto de rotulação quimioluminescente não é imobilizado para uma superfície sólida, tal como uma partícula, placa de multicavidade, ou membrana, filtro, tubo de teste, vareta, ou ponta de pipeta como é encontrado em outros métodos e ensaios de afinidade.

[00050] O sbp rotulado por quimioluminescente inclui um composto

de rótulo quimioluminescente e um membro de um par de ligações específico.

[00051] Em algumas modalidades, um sbp rotulado por quimioluminescente inclui um ou mais compostos de rótulo quimioluminescente.

[00052] Em algumas modalidades, um sbp rotulado por quimioluminescente inclui uma ou mais cópias de um membro de um par de ligações específico.

[00053] Em algumas modalidades, um composto de rótulo quimioluminescente é diretamente conectado com uma ou mais cópias de um membro de um par de ligações específico. Em algumas outras modalidades, um ou mais compostos de rótulo quimioluminescente são diretamente conectados a uma cópia de um membro de um par de ligações específico. As conexões diretas, também referidas como diretamente rotulado; incluem interações de ligação covalente, interações de ligação iônica, e interações hidrofóbicas. Em uma modalidade o rótulo quimioluminescente é covalentemente ligado a um par de ligações específico para o analito.

[00054] Em algumas modalidades, um composto de rótulo quimioluminescente é indiretamente conectado a uma ou mais cópias de um membro de um par de ligações específico. Em algumas outras modalidades, um ou mais compostos de rótulo quimioluminescente são indiretamente conectados a uma cópia de um membro de um par de ligações específico. As conexões indiretas incluem uma ou mais substâncias auxiliares além de um composto de rótulo quimioluminescente e um membro de um par de ligações específico.

[00055] As substâncias auxiliares são solúveis em solução aquosa. Sbp's rotulados por quimioluminescente que incluem uma ou mais substâncias auxiliares são solúveis em solução aquosa.

[00056] Em várias modalidades, as substâncias auxiliares incluem

proteínas solúveis (por exemplo, estreptavidina, avidina, neutravidina, biotina, BSA cationizado, fos, jun, hemocianina lapa em buraco de fechadura "KLH", imunoglobulinas e fragmentos ou porções dos mesmos, quer nativo ou construído, dendrímeros sintéticos solúveis (por exemplo, PAMAM), polímeros sintéticos solúveis (por exemplo, ácido poliacrílico "PAA"), polímeros naturais solúveis (por exemplo, polissacarídeos tais como dextranos funcionalizados, amino-dextrano, oligonucleotídeos, proteínas, e quaisquer combinações dos mesmos), lipossomas, micelas, e vesículas, bem como combinações de um ou mais de polímeros sintéticos solúveis, polímeros naturais solúveis, e proteínas solúveis (por exemplo, IgG/Biotina/estreptavidina/PAA). Outras substâncias auxiliares que são solúveis em solução aquosa e funcionalizáveis para ligação a um ou mais compostos de rótulo quimioluminescente e/ou sbp's são pretendidas para uso nos ensaios e métodos descritos.

[00057] Em algumas modalidades, a substância auxiliar a qual o rótulo quimioluminescente é covalentemente ligado é uma proteína ou peptídeo. As proteínas solúveis exemplares incluem albuminas, avidinas, estreptavidina, avidina, proteínas alfa-hélice, fos, jun, hemocianina lapa em buraco de fechadura "KLH", imunoglobulinas e fragmentos ou porções dos mesmos, quer nativo ou construído, e quaisquer combinações dos mesmos. Em uma modalidade, uma substância auxiliar é um anticorpo universal, tal como IgG, sendo que o rótulo quimioluminescente é covalentemente ligado ao anticorpo universal de uma maneira para manter sua afinidade de ligação para um anticorpo de captura específico de analito. Em outra modalidade de sbp rotulado por quimioluminescente, o composto quimioluminescente é conectado a um ou mais sbp's através de uma ligação de biotina-estreptavidina ou biotina-neutravidina. Os sbp's rotulados por quimioluminescente incorporando estreptavidina-biotina,

ou ligações equivalentes, podem, por exemplo, fornecer o par de ligações específico como um conjugado de biotina onde o composto quimioluminescente é um conjugado de estreptavidina. As disposições alternativas de biotina-estreptavidina e ligações similares são geralmente conhecidas. Alternativamente sbp's rotulados por quimioluminescente incorporando estreptavidina-biotina, ou ligações equivalentes, podem utilizar a ligação para prender sbp ou compostos quimioluminescentes a uma ou mais substâncias auxiliares adicionais.

[00058] Em outra modalidade, uma substância auxiliar a qual o rótulo quimioluminescente é covalentemente ligado é um polímero sintético. Os formatos de ensaio utilizando auxiliares poliméricos para conectar o composto quimioluminescente podem se conectar ao par de ligações específico para o analito por ligação covalente, como conjugado de biotina-avidina, ou por ligação indireta através de um componente de captura universal tal como uma imunoglobulina específica de espécies. An

[00059] Em modalidades selecionadas, o sbp rotulado por quimioluminescente inclui uma substância auxiliar selecionada de polissacarídeos ou proteínas de automontagem solúveis. Em algumas modalidades, sbp rotulado por quimioluminescente inclui um polissacarídeo tal como amino-dextrano ou carboxila-dextrano. Em algumas tais modalidades, um polissacarídeo, tal como amino-dextrano ou carboxil-dextrano, tem um peso molecular médio na faixa de 10kDa a 500kDa, e em outras modalidades, tem um peso molecular médio na faixa de 25-150 kDa. Em uma outra modalidade, um sbp rotulado por quimioluminescente inclui um polissacarídeo, tal como amino-dextrano ou carboxila-dextrano tendo um peso molecular médio na faixa de 50-100 kDa. Em ainda uma outra modalidade, um sbp rotulado por quimioluminescente inclui um polissacarídeo, tal como amino-dextrano ou carboxila-dextrano tendo um peso molecular médio

de 70 kDa.

[00060] Em muitas modalidades, o diâmetro médio do sbp rotulado por quimioluminescente está na faixa inclusiva de 5nM a 800nM. Em modalidades selecionadas, a incorporação de proteínas solúveis, ou outros polímeros naturais solúveis ou polímeros sintéticos solúveis, ou combinações dos mesmos, o diâmetro médio do sbp rotulado por quimioluminescente está na faixa inclusiva de 200nM a 600nM, em algumas outras modalidades, na faixa inclusiva de 300nM a 500nM.

SBP ROTULADO POR ATIVADOR

[00061] Os métodos requerem o uso de um composto ativador conectado com um primeiro par de ligações específico ("sbp rotulado por ativador"),

[00062] Nos ensaios e métodos da presente descrição, o sbp rotulado por ativador é solúvel em solução aquosa. Nos ensaios e métodos da presente descrição, o composto ativador não é imobilizado para uma superfície sólida, tal como uma partícula, placa de multicavidade, ou membrana, filtro, tubo de teste, vareta, ou ponta de pipeta como é encontrado em outros métodos e ensaios de afinidade.

[00063] O sbp rotulado por ativador inclui um composto de rótulo ativador e um membro de um par de ligações específico.

[00064] Em algumas modalidades, um sbp rotulado por ativador inclui um ou mais compostos ativadores.

[00065] Em algumas modalidades, um sbp rotulado por ativador inclui uma ou mais cópias de um membro de um par de ligações específico.

[00066] Em algumas modalidades, um composto ativador está diretamente conectado a uma ou mais cópias de um membro de um par de ligações específico. Em algumas outras modalidades, um ou mais compostos de rótulo ativador estão diretamente conectados a uma cópia de um membro de um par de ligações específico. As

conexões diretas, também referidas como diretamente rotulado, incluem interações de ligação covalente, interações de ligação iônica, e interações hidrofóbicas. Em uma modalidade o rótulo ativador é covalentemente ligado a um par de ligações específico para o analito.

[00067] Em algumas modalidades, um composto ativador é indiretamente conectado a uma ou mais cópias de um membro de um par de ligações específico. Em algumas outras modalidades, um ou mais compostos ativadores são indiretamente conectados a uma cópia de um membro de um par de ligações específico. As conexões indiretas incluem substâncias auxiliares além de um composto de rótulo quimioluminescente e um membro de um par de ligações específico.

[00068] As substâncias auxiliares são geralmente solúveis em solução aquosa. Sbp's rotulados por ativador os quais incluem uma ou mais substâncias auxiliares são solúveis em solução aquosa. Em várias modalidades, as substâncias auxiliares incluem proteínas solúveis (por exemplo, estreptavidina, avidina, neutravidina, biotina, BSA cationizado, fos, jun, hemocianina lapa em buraco de fechadura "KLH", imunoglobulinas e fragmentos ou porções dos mesmos, quer nativo ou construído, e quaisquer combinações dos mesmos), dendrímeros sintéticos solúveis (por exemplo, PAMAM), polímeros sintéticos solúveis (por exemplo, ácido poliacrílico "PAA"), polímeros naturais solúveis (por exemplo, polissacarídeos tais como dextrano, oligonucleotídeos, proteínas, e quaisquer combinações dos mesmos), lipossomas, micelas, e vesículas, bem como combinações de um ou mais de polímeros sintéticos solúveis, polímeros naturais solúveis, e proteínas solúveis (por exemplo, IgG/Biotina/estreptavidina/PAA). Outras substâncias auxiliares que são solúveis em solução aquosa e funcionalizáveis para ligação a um ou mais compostos de rótulo ativador e/ou sbp's são pretendidos para uso nos ensaios e métodos

descritos.

[00069] Em algumas modalidades, a substância auxiliar a qual o rótulo ativador é covalentemente ligado é uma proteína ou peptídeo. As proteínas solúveis exemplares incluem albuminas, avidinas, estreptavidina, avidina, proteínas hélice alfa, fos, jun, hemocianina lapa em buraco de fechadura "KLH", imunoglobulinas e fragmentos e porções dos mesmos, quer nativo ou construído, e quaisquer combinações dos mesmos. Em uma modalidade, a substância auxiliar é um anticorpo universal, tal como IgG, sendo que o rótulo ativador é covalentemente ligado ao anticorpo universal de uma maneira para manter sua afinidade de ligação para um anticorpo de captura específico de analito. Em outra modalidade de sbp rotulado por ativador, o composto ativador é conectado a um ou mais sbp's através de uma ligação de biotina-estreptavidina. Sbp rotulado por ativador incorporando estreptavidina-biotina, ou ligações equivalentes, podem, por exemplo, fornecer o par de ligações específico como um conjugado de biotina onde o composto ativador é um conjugado de estreptavidina. Disposições alternativas de biotina-estreptavidina e ligações similares são geralmente conhecidas. Alternativamente sbp's rotulados por ativador incorporando estreptavidina-biotina, ou ligações equivalentes, podem utilizar a ligação para união de sbp ou compostos ativadores a uma ou mais substâncias auxiliares adicionais.

[00070] Em outra modalidade, uma substância auxiliar a qual o rótulo ativador é covalentemente ligado é um polímero sintético. Os formatos de ensaio utilizando auxiliares poliméricos para conectar o composto ativador podem se conectar ao par de ligações específico para o analito por ligação covalente, ligação não covalente, ou por união indireta através de um componente de captura universal tal como uma imunoglobulina específica de espécies ou conjugação de biotina-avidina.

[00071] Nas modalidades selecionadas, o sbp rotulado por ativador inclui uma substância auxiliar selecionada de polissacarídeos ou proteínas de automontagem solúveis. Em algumas modalidades, um sbp rotulado por ativador inclui um polissacarídeo tal como amino-dextrano ou carboxila-dextrano. Em algumas tais modalidades, um polissacarídeo, tal como amino-dextrano ou carboxila-dextrano, tem um peso molecular médio na faixa de 10kDa a 500kDa, ou em outras modalidades tem um peso molecular médio na faixa de 25kDa a 150kDa. Em uma outra modalidade, um sbp rotulado por quimioluminescente inclui um polissacarídeo, tal como amino-dextrano ou carboxila-dextrano tendo um peso molecular médio na faixa de 50-100 kDa. Em ainda uma outra modalidade um sbp rotulado por quimioluminescente inclui um polissacarídeo, tal como amino-dextrano ou carboxila-dextrano tendo um peso molecular médio de 70 kDa.

[00072] Na maioria das modalidades, o peso molecular médio do sbp rotulado por ativador está na faixa inclusiva de 200 kDa a 3000 kDa. Em algumas modalidades, o peso molecular médio do par de ligações específico rotulado por ativador é tipicamente 350 kDa a 1500 kDa.

RÓTULOS ATIVADORES

[00073] O composto ativador forma parte de um sbp rotulado por ativador, que pode também ser referido como conjugado de ativador-par de ligações específico. O sbp rotulado por ativador serve uma função dual: 1) sofrer uma reação de ligação específica na proporção da quantidade do analito no ensaio através da porção de par de ligações específico, diretamente ou através de um par de ligações específico intermediário, e 2) ativar o composto quimioluminescente através da porção do ativador. A porção do ativador do sbp rotulado por ativador é um composto que afeta a ativação do composto quimioluminescente de modo que, na presença da solução ativadora,

quimioluminescência seja produzida. Os compostos capazes de servir como o rótulo ativador incluem compostos com atividade semelhante a peroxidase incluindo sais de metal de transição e complexos e enzimas, especialmente enzimas contendo metal de transição, mais especialmente enzimas peroxidase. Os metais de transição úteis em compostos ativadores incluem aqueles dos grupos 3-12 da tabela periódica, especialmente ferro, cobre, cobalto, zinco, manganês, cromo, e vanádio.

[00074] As enzimas peroxidase que podem sofrer a reação quimioluminescente incluem, por exemplo, lactoperoxidase, microperoxidase, mieloperoxidase, haloperoxidase, vanádio bromoperoxidase, peroxidase de rábano silvestre, peroxidases fúngicas, lignina peroxidase, peroxidase de *Arthromyces ramosus*, peroxidase dependente de Mn produzida em fungo de putrefação branca, e soja peroxidase. Outros compostos miméticos de peroxidase são conhecidos os quais não são enzimas, porém, possuem atividade semelhante à peroxidase incluindo complexos de ferro, tais como heme, e Mn-TPPS4 (Y.-X. Ci, e outros, *Mikrochem. J.*, 52, 257-62 (1995)). Estes catalisam a oxidação quimioluminescente de substratos e são explicitamente considerados estarem dentro do escopo do significado de peroxidase como utilizado aqui.

[00075] Em algumas modalidades, sbp rotulado por ativador pode incluir conjugados ou complexos de uma peroxidase e uma molécula biológica em métodos para produzir quimioluminescência, a única condição sendo que o conjugado exibe peroxidase ou atividade semelhante à peroxidase. As moléculas biológicas que podem ser conjugadas por uma ou mais moléculas de uma peroxidase incluem DNA, RNA, oligonucleotídeos, anticorpos, fragmentos de anticorpo, quimeras de anticorpo-DNA, antígeno, haptenos, proteínas, peptídeos, lectinas, avidina, estreptavidina e biotina. Complexos incluindo ou

incorporando uma peroxidase, tal como lipossomas, micelas, vesículas e polímeros que são funcionalizados para unirem-se às moléculas biológicas, podem também ser utilizados nos métodos da presente descrição.

AGENTES DE INIBIÇÃO DE SINAL SELETIVOS (SSIA)

[00076] Os agentes de inibição de sinal seletivos da presente invenção são compostos que quando incluídos em uma mistura de reação de ensaio compreendendo sbp rotulado por quimioluminescente livre e/ou ligado ao analito, sbp rotulado por ativador livre e/ou ligado ao analito, realçador e uma solução ativadora, tal que o sinal resultante do analito-membros de sbp rotulados ligados exceda o sinal de base por um grau significativamente maior do que ocorre na ausência do SSIA.

[00077] Um ou mais agentes de inibição de sinal seletivos estão presentes nos métodos de reação em concentração entre 10^{-6} M e 10^{-1} M, frequentemente entre 10^{-6} M e 10^{-2} M, geralmente entre 10^{-5} M e 10^{-3} M, algumas vezes entre 10^{-5} M e 10^{-4} M. Em algumas modalidades, um agente de inibição de sinal seletivo está presente entre 5×10^{-6} M e 5×10^{-4} M em reações de acordo com os presentes métodos. Em ainda outras modalidades, um agente de inibição de sinal seletivo está presente entre 5×10^{-5} M e 5×10^{-4} M em reações de acordo com os presentes métodos.

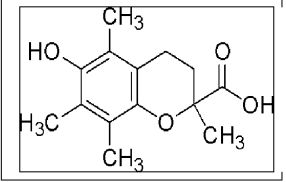
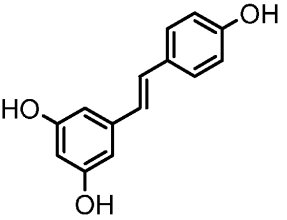
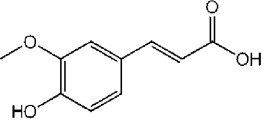
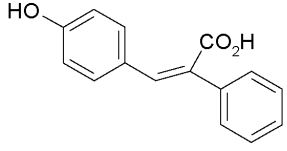
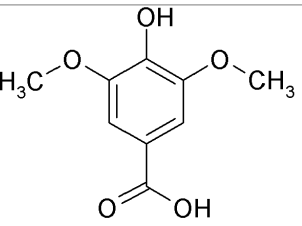
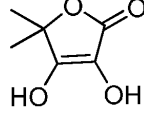
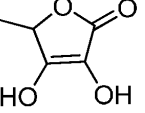
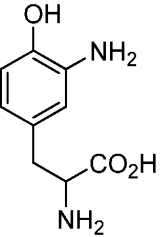
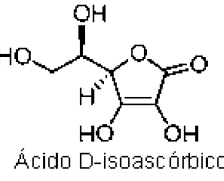
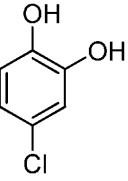
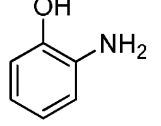
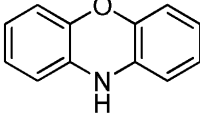
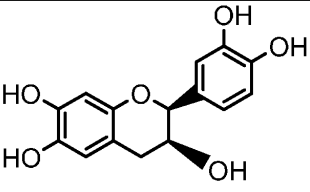
[00078] O agente de inibição de sinal seletivo pode ser fornecido como uma solução ou reagente separado em uma concentração mais elevada do que é pretendido na solução de reação. Nesta modalidade uma quantidade medida da solução de trabalho é dosada na solução de reação para obter a concentração de reação desejada. Em outra modalidade o agente de inibição de sinal seletivo é combinado em uma solução contendo um ou mais dos membros de sbp rotulados. Em outra modalidade o agente de inibição de sinal seletivo é fornecido

como um componente da solução ativadora.

[00079] O grau ao qual o agente de inibição de sinal seletivo melhora a relação de sinal : base variará dependendo da identidade do composto e da concentração na qual ele é utilizada, entre outros fatores. O grau pode ser estruturado em termos de um fator de melhora no qual a relação de sinal: base de um ensaio em uma concentração de analito particular sendo que o ensaio é realizado com o agente de inibição de sinal seletivo é comparado com a relação de sinal : base de um ensaio na mesma concentração de analito sem o agente de inibição de sinal seletivo. Um fator de melhora > 1 é um gauge de um ensaio melhorado e evidência de um efeito benéfico do agente de inibição de sinal seletivo. Nas modalidades da invenção, os fatores de melhora de pelo menos 2, tal como pelo menos 5 e incluindo pelo menos 10, ou pelo menos 50 são obtidos. Será observado em referência aos exemplos abaixo, que fatores de melhora podem variar dentro de um ensaio como uma função da concentração de analito. Por exemplo, fatores de melhora podem aumentar quando a concentração de analito aumenta. Em outra modalidade a variação no fator de melhora através de uma concentração pode resultar em uma curva de calibração mais linear, isto é, plote de intensidade de quimioluminescência vs. concentração de analito.

[00080] A seguinte tabela lista sem limitação, compostos capazes de funcionar eficazmente como agentes de inibição de sinal seletivo. Os compostos adicionais, não explicitamente recitados, podem ser encontrados utilizando os ensinamentos da presente descrição, incluindo por aplicação de rotina do ensaio e avaliando os métodos de teste descritos nos exemplos.

Tabela 1 Agentes de inibição de sinal seletivo

Glutationa	Ácido ascórbico ou sais dos mesmos
Ácido úrico	6-Palmitato de ácido L-Ascórbico
(±)-a- Tocoferol	Ácido 5,6-Isopropilideno-L-Ascórbico
(+)-y- Tocoferol	Hidroxitolueno Butilado (BHT)
	
	 GW7.35
	
	
 Ácido D-Isoascórbico	
	
	Na ₂ SO ₃
	Et ₂ NOH

[00081] Em algumas outras modalidades, o agente de inibição de sinal seletivo é selecionado de aminas de dialquilidróxi.

[00082] Em algumas modalidades, o agente de inibição de sinal seletivo é selecionado de compostos aromáticos tendo pelo menos dois grupos hidroxila orientados em uma orto-, ou para-relação. Os compostos exemplares são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2:

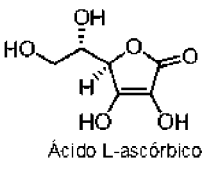
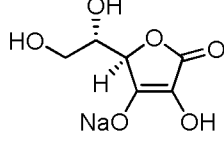
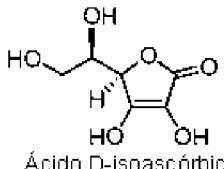
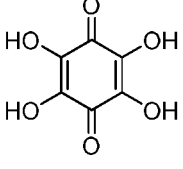
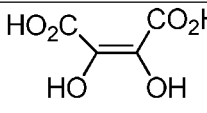
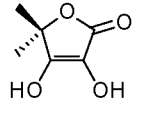
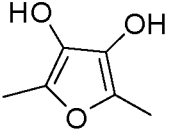
[00083] Em algumas outras modalidades, o agente de inibição de sinal seletivo é selecionado de compostos aromáticos tendo pelo menos um grupo hidróxi e um grupo amino orientado em uma orto-, ou para-relação. Os compostos exemplares são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3.

[00084] Em ainda outras modalidades, o agente de inibição de sinal seletivo é selecionado de compostos tendo pelo menos dois grupos

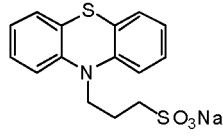

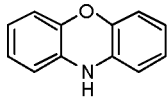
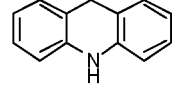
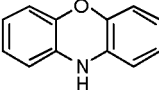
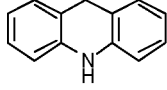
hidroxila substituídos em uma ligação dupla C-C, também conhecida como um enediol. Compostos exemplares são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4.

 Ácido L-ascórbico	 NaO	 Ácido D-isoascórbico	
			

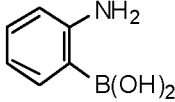
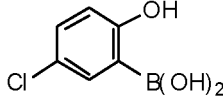
[00085] Em uma modalidade, o agente de inibição de sinal seletivo é selecionado de compostos heterocíclicos de nitrogênio. Os compostos exemplares são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5.

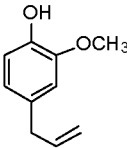
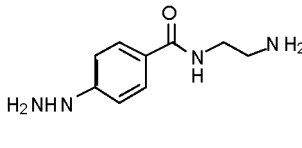
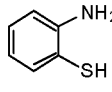
[00086] Em uma modalidade, o agente de inibição de sinal seletivo é fornecido na forma mascarada como um composto que é conversível no SSIA ativo em contato com peróxido. Os compostos SSIA mascarados adequados são, por exemplo, selecionados de compostos de ácido arilborônico substituídos por hidroxila ou amino. Os compostos exemplares são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6.

	
---	---

[00087] Em uma modalidade, o agente de inibição de sinal seletivo é selecionado dos compostos mostrados na Tabela 7.

Tabela 7.

		
---	---	---

[00088] Em várias modalidades, um ou mais dos agentes de inibição de sinal seletivos acima são utilizados em combinação em métodos de ensaio, ensaios e *kits* da presente descrição. Em algumas modalidades, os agentes de inibição de sinal seletivos têm solubilidade em solução aquosa em concentração de solução de trabalho de 10 vezes. A solução de trabalho é definida como uma solução aquosa concentrada, tal que uma porção da solução concentrada seja adicionada à Mistura de Reação para produzir a concentração final requerida após a adição de solução ativadora.

[00089] As soluções aquosas adequadas para soluções de trabalho de agente de inibição de sinal seletivo incluem um ou mais dos seguintes componentes adicionais: sais, tampões biológicos, sulfóxido de dimetila (DMSO), dimetilformamida (DMF), álcoois, incluindo etanol, metanol, glicóis, e detergentes. Em algumas modalidades, as soluções aquosas incluem Soluções aquosas tamponadas Tris, 25% de Etanol/75% de Solução aquosa tamponada Tris, 25% de Etanol/75% de Triton-X-100 aquoso (1%), 10% NaOH a 0,1 N/ 90% de Solução aquosa tamponada Tris. Um exemplo de Solução aquosa tamponada Tris é composto de Salina tamponada TRIS, tensoativo, <0,1% de azida de sódio, e 0,1% de ProClin® 300 (Rohm and Haas)), referido aqui como Tampão II e está disponível comercialmente de Beckman Coulter, Inc., Brea CA.

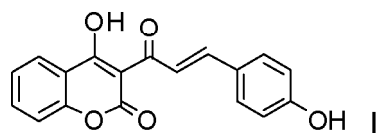
REALÇADORES & SOLUÇÕES ATIVADORAS

[00090] A solução ativadora fornece um reagente necessário para gerar o composto de estado excitado necessário para quimioluminescência. O reagente pode ser aquele necessário para

realizar a reação quimioluminescente reagindo-se diretamente com o rótulo quimioluminescente. Pode servir em vez de ou além desta função para facilitar a ação do composto ativador. Este sera o caso, por exemplo, quando o ativador for uma enzima peroxidase. Em uma modalidade a solução ativadora compreende um composto de peróxido. O componente de peróxido é qualquer peróxido ou hidroperóxido de alquila capaz de reagir com a peroxidase. Os peróxidos exemplares incluem peróxido de hidrogênio, peróxido de ureia, e sais de perborato. A concentração de peróxido utilizada na solução ativadora pode ser variada em uma faixa de valores, tipicamente de cerca de 10^{-8} M a cerca de 3 M, mais geralmente de cerca de 10^{-3} M a cerca de 10^{-1} M. Em outra modalidade a solução ativadora compreende peróxido e um composto realçador que promove a regeneração catalítica de um ativador tendo atividade peroxidase activity.

[00091] Uma modalidade representativa utiliza um conjugado de peroxidase como o ativador, um par de ligações específico rotulado por acridan de um analito sendo que o rótulo de acridan é fornecido reagindo-se o par de ligações específico com um composto de rotulação de acridan como descrito abaixo, e uma solução ativadora compreendendo peróxido de hidrogênio. O peróxido reage com a peroxidase, presumivelmente para alterar o estado de oxidação do ferro no sítio ativo da enzima para um estado de oxidação diferente. Este estado alterado da enzima reage com uma molécula realçadora para promover a regeneração catalítica da enzima. Uma espécie reativa formada do realçador ou da enzima reage com o rótulo acridan mantido em proximidade com a enzima. A reação quimioluminescente compreende outra reação de um intermediário formado do composto quimioluminescente com peróxido para produzir o último produto de reação e luz.

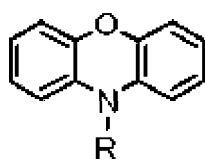
[00092] A incorporação de certos compostos realçadores na solução ativadora promove a reatividade da enzima ou reduz o sinal de base ou realiza ambas as funções. Incluídos entre estes realçadores estão os compostos fenólicos e aminas aromáticas conhecidas por realçarem reações de peroxidase. As misturas de um composto defenoxazina ou fenotiazina com um composto de indofenol ou indoanilina como descrito na Patente dos Estados Unidos 5.171.668 podem ser utilizadas como realçador na presente invenção. Hidroxibenzoxazóis substituídos, 2-hidróxi-9-fluorenona, e composto I,



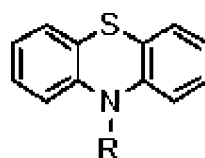
como descrito na Patente dos Estados Unidos 5.206.149, pode também ser utilizado como realçador na presente invenção. Os compostos de ácido arilborônio substituído e não substituídos e seus derivados de éster e nitrato são descritos na Patente dos Estados Unidos Nº 5.512.451 são também considerados estarem no escopo dos realçadores úteis na presente descrição. Os realçadores fenólicos exemplares incluem, porém, não estão limitados a: p-fenilfenol, p-iodofenol, p-bromofenol, ácido p-hidroxicinâmico, p-imidazolilfenol, acetaminofeno, 2,4-diclorofenol, 2-naftol e 6-bromo-2-naftol.

[00093] As misturas de mais do que um realçador destas classes mencionadas acima podem também ser empregadas.

[00094] Os realçadores adicionais que são úteis na prática da presente invenção são derivados incluem compostos de hidroxibenzotiazol e compostos de fenoxazina e fenotiazina das fórmulas II e III abaixo.



e



II e III

[00095] Os grupos R substituídos no átomo de hidrogênio de realçadores de fenoxazina e fenotiazina incluem alquila de 1-8 átomos de carbono, e alquila de 1-8 átomos de carbono substituído com um grupo de sal de sulfonato ou sal de carboxilato. Os realçadores exemplares incluem sais de ácido 3-(N-fenotiazinil)-propanossulfônico, sais de ácido 3-(N-fenoxazinil)propanossulfônico, sais de ácido 4-(N-fenoxazinil)butanossulfônico, sais de ácido 5-(N-fenoxazinil)pentanoico e N-metilfenoxazina e homólogos relacionados. A concentração de realçadores utilizada na solução ativadora pode ser variada em uma faixa de valores, tipicamente de cerca de 10^{-5} M a cerca de 10^{-1} M, mais geralmente de cerca de 10^{-4} M a cerca de 10^{-2} M.

[00096] A reação de detecção da presente descrição é realizada com uma solução ativadora que está tipicamente em um tampão aquoso. Os tampões adequados incluem quaisquer dos tampões geralmente utilizados capazes de manter um ambiente permitindo que a reação quimioluminescente prossiga. Tipicamente a solução ativadora terá um pH na faixa de cerca de 5 a cerca de 10,5. Os tampões exemplares incluem fosfato, borato, acetato, carbonato, tris(hidróxi-metilamino)metano[tris], glicina, tricina, 2-amino-2-meil-1-propanol, dietanolamina MOPS, HEPES, MES e similares.

[00097] A solução ativadora pode também conter um ou mais detergentes ou tensoativos poliméricos para realçar a eficiência de luminescência da reação de produção de luz ou melhorar a relação de sinal/ruído do ensaio. Os tensoativos não iônicos úteis na prática da presente descrição incluem por modo de exemplo alquilfenóis polioxietilenados, álcoois polioxietilenados, éteres polioxietilenados e ésteres de sorbitol polioxietilenado. Os tensoativos catiônicos monoméricos, incluindo compostos de sal de amônio quaternário tais como CTAB e compostos de sal de fosfônio quaternário podem ser

utilizados. Os tensoativos catiônicos poliméricos incluindo aqueles compreendendo grupos de sal de amônio quaternário e sal de fosfônio podem também ser utilizados para este propósito.

[00098] Em uma modalidade, a solução ativadora é uma composição compreendendo um tampão aquoso, um peróxido em uma concentração de cerca de 10^{-5} M a cerca de 1M, e um realçador em uma concentração de cerca de 10^{-5} M a cerca de 10^{-1} M. A composição pode opcionalmente conter aditivos incluindo tensoativos, agentes de quelação de metal, e preservativos para prevenir ou minimizar a contaminação microbiana. O pH da solução ativadora é tipicamente entre pH 6,0 a pH 9,0. Em algumas modalidades, o pH é de pH 6,5 a pH 8,5, em outras modalidades o pH é na faixa de pH 7,0-8,0.

PARES DE LIGAÇÕES ESPECÍFICOS

[00099] Um membro de par de ligações específico ou par de ligações específico (sbp) é definido aqui como uma molécula, incluindo moléculas biológicas, tendo uma afinidade de ligação específica para outra substância. Um membro de par de ligações específico inclui DNA, RNA, oligonucleotídeos, anticorpos, fragmentos de anticorpo, quimeras de anticorpo-DNA, antígenos, haptenos, proteínas, peptídeos, lectinas, avidina, estreptavidina e biotina. Cada membro de par de ligações específico de um par de ligações específico tem afinidade de ligação específica para a mesma substância (por exemplo, analito). Cada membro de par de ligações específico é não idêntico ao outro membro de par de ligações específico em um par de ligações específico em pelo menos que o membro de par de ligações específicos não deve competir para o mesmo ou sítio de ligação sobreposto em um analito. Por exemplo, se um par de ligações específico é composto de dois anticorpos, cada anticorpo de sbp tem um epítipo diferente, de não competição no analito.

[000100] As substâncias de ligação específicas incluem, sem limitação, anticorpos e fragmentos de anticorpos, antígenos, haptenos, e seus anticorpos cognatos, biotina e avidina ou estreptavidina, proteína A e IgG, ácido nucleicos ou oligonucleotídeos complementares, lectinas e carboidratos.

[000101] Além dos pares de antígeno-anticorpo mencionado acima, os pares de hapteno-anticorpo ou anticorpo-anticorpo, pares de ligações específicos também podem incluir oligonucleotídeos ou polinucleotídeos complementares, avidina-biotina, estreptavidina-biotina, hormônio-receptor, lectina-carboidrato, proteína A de IgG, proteína de ligação-receptor, proteína de ligação de ácido nucleico-ácido nucleico e anticorpo de ácido nucleico-anti-ácido nucleico. Os ensaios de receptor utilizados na avaliação de candidatos a fármaco são outra área de uso para os presentes métodos. Quaisquer destes pares de ligação podem ser adaptados para utilizar nos presentes métodos pela técnica de sanduíche de três componentes ou a técnica competitiva de dois componentes descrita acima.

Compostos quimioluminescentes

[000102] Os compostos utilizados como rótulos quimioluminescentes na prática da presente descrição têm a fórmula geral CL-L-RG sendo que CL significa uma porção quimioluminescente, L significa uma porção de ligação para ligar a porção quimioluminescente e um grupo reativo, e RG significa uma porção de grupo reativo para se acoplar a outro material. Os termos `grupo quimioluminescente` e `porção quimioluminescente` são utilizados alternadamente como os termos `porção de ligação` e `grupo de ligação`. A porção quimioluminescente CL compreende um composto que sofre uma reação com um ativador resultando nele sendo convertido em um composto ativado. A reação do composto ativado com uma solução ativadora forma um composto de estado eletronicamente excitado. O estado excitado pode ser ou

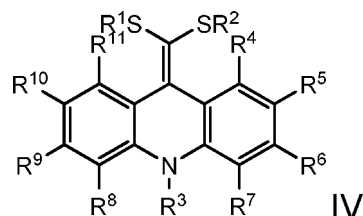
um estado excitado singlete ou tripleto. O estado excitado pode diretamente emitir luz sob relaxamento para o estado de base ou pode transferir energia de excitação para um receptor de energia emissivo, desse modo retornando ao estado de base. O receptor de energia é elevado para um estado excitado no processo e emite luz. É desejável, porém, não necessário que a reação quimioluminescente do grupo CL, o ativador e a solução ativadora seja rápida, ocorrendo durante um período de tempo muito curto; em uma modalidade alcançando a intensidade máxima em alguns segundos.

[000103] Em uma modalidade da descrição, os compostos quimioluminescentes são capazes de serem oxidado para produzir quimioluminescência na presença do ativador e da solução ativadora. Uma classe exemplar de compostos que por incorporação de um ligador e grupo reativo poderiam servir como o rótulo quimioluminescente inclui diacilidrazidas cíclicas aromáticas tais como luminol e hidrazidas cíclicas estruturalmente relacionadas incluindo isoluminol, aminobutiletisoluminol (ABEI), aminoexiletisoluminol (AHEI), hidrazida de ácido 7-dimetilaminonaftaleno-1,2-dicarboxílico, aminoftalidrazidas substituídas por anel, hidrazidas de ácido antraceno-2,3-dicarboxílico, hidrazidas de ácido fenantreno-1,2-dicarboxílico, hidrazidas de ácido pirenodicarboxílico, 5-hidroxitfalidrazida, 6-hidroxitfalidrazida, bem como outros análogos de ftalazinadiona ddescritos na Patente dos Estados Unidos Nº 5.420.275 de Masuya e *outros* e na Patente dos Estados Unidos Nº 5.324.835 de Yamaguchi.

[000104] É considerado que qualquer composto conhecido por produzir quimioluminescência pela ação de peróxido de hidrogênio e uma peroxidase funcione como a porção quimioluminescente do composto de rótulo quimioluminescente utilizado na presente descrição. Numerosos tais compostos de várias classes estruturais,

incluindo tinturas de xanteno tais como tinturas de fluoresceína, eosina, rodamina, ou tinturas de rodol, aminas aromáticas e aminas heterocíclicas são conhecidas na técnica por produzirem quimioluminescência sob estas condições. Outro exemplo é o composto MCLA, 2-metil-6-(p-metóxfenil)-3,7-di-hidroimidazo[1,2-a]pirazin-3-ona. Outro exemplo é ácido acético de indol, outro é isobutiraldeído, o último tipicamente sendo acompanhado por um receptor de energia fluorescente para aumentar a produção de luz visível. Os compostos tri-hidroxiaromáticos pirogalol, floroglucinol e purpurogalina, individualmente ou em combinação, são outros exemplos de compostos que podem servir como frações quimioluminescentes nos compostos de quimioluminescência de rótulo da descrição.

[000105] Em uma modalidade, um grupo de compostos de rótulo quimioluminescente compreendendo um cetenoeditioacetal de acridan (AK) útil nos métodos da descrição compreende compostos de acridan tendo a fórmula IV



sendo que pelo menos um dos grupos R^1 - R^{11} é um substituinte de rotulação da fórmula -L-RG sendo que L é um grupo de ligação que pode ser um grupo ligado ou outro grupo divalente ou polivalente, RG é um grupo reativo que permite que o composto de quimioluminescência de rótulo seja ligado a outro composto, R^1 , R^2 e R^3 são grupos orgânicos contendo de 1 a 50 átomos de não hidrogênio, e cada de R^4 - R^{11} é hidrogênio ou um substituinte não interferente. O substituinte de rotulação -L-RG pode estar presente em um dos R^1 ou R^2 embora possa estar presente como um substituinte

em R³ ou um dentre R⁴-R¹¹.

[000106] Os grupos R¹ e R² no composto da fórmula IV podem ser qualquer grupo orgânico contendo de 1 a cerca de 50 átomos de não hidrogênio selecionados de C, N, O, S, P, Si e átomos de halogênio que permitem a produção de luz. Pelo ultimo é entendido que quando um composto da fórmula I passa por uma reação da presente descrição, um composto de produto de estado excitado é produzido e pode envolver a produção de um ou mais intermediários quimioluminescentes. O produto de estado excitado pode emitir a luz diretamente ou pode transferir a energia de excitação para um receptor fluorescente através da transferência de energia fazendo com que a luz seja emitida do receptor fluorescente. Em uma modalidade R¹ e R² são selecionados de grupos alquila substituída ou não substituída, alquenila substituída ou não substituída, alquinila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, e aralquila substituída ou não substituída de 1-20 átomos de carbono. Quando R¹ ou R² é um grupo substituído, pode ser substituído com 1-3 grupos selecionados de grupos carbonila, grupos carboxila, grupos tri(C₁-C₈ alquil)silila, um grupo SO₃⁻, um grupo OSO₃⁻², grupos glicosila, um grupo PO₃⁻, um grupo OPO₃⁻², átomos de halogênio, um grupo hidroxila, um grupo tiol, grupos amino, grupos de amônio quaternário, e grupos fosfônio quaternário. Em uma modalidade, R¹ ou R² é substituído com o substituinte de rotulação da fórmula -L-RG onde L é um grupo de ligação e RG é um grupo reativo.

[000107] O grupo R³ é um grupo orgânico contendo de 1 a 50 átomos de não hidrogênio selecionados de C, N, O, S, P, Si e halogênio além do número necessário de átomos H requeridos para satisfazer as valências dos átomos no grupo. Em uma modalidade R³ contém de 1 a 20 átomos de não hidrogênio. Em outra modalidade o grupo orgânico é selecionado do grupo consistindo em grupos alquila,

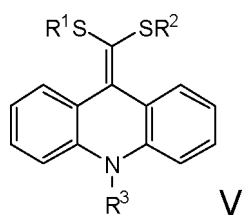
alquila substituída, alquênica substituída ou não substituída, alquinila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, e aralquila substituída ou não substituída de 1-20 átomos de carbono. Em outra modalidade os grupos para R^3 incluem grupos C_1-C_4 alquila substituída ou não substituída, fenila, grupos benzila substituída ou não substituída, grupos alcóxialquila, carboxialquila e ácido alquilsulfônico. Quando R^3 é um grupo substituído, pode ser substituído com 1-3 grupos selecionados de grupos carbonila, grupos carboxila, grupos tri(C_1-C_8 alquil)silila, um grupo SO_3^- , um grupo OSO_3^{2-} , grupos glicosila, um grupo PO_3^- , um grupo OPO_3^{2-} , átomos de halogênio, um grupo hidroxila, um grupo tiol, grupos amino, grupos amônio quaternário, e grupos fosfônio quaternário. O grupo R^3 pode ser unido a R^7 ou R^8 para completar um anel de 5 ou 6 membros. Em uma modalidade, R^3 é substituído com o substituinte de rotulação da fórmula -L-RG.

[000108] Nos compostos da fórmula IV, os grupos R^4-R^{11} cada são independentemente H ou um grupo substituinte que permite que o produto de estado excitado seja produzido e geralmente contém de 1 a 50 átomos selecionados de C, N, O, S, P, Si e halogênios. Os grupos de substituinte representativos que podem estar presente incluem, sem limitação, grupos alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, aralquila, alquênica, alquinila, alcóxi, arilóxi, halogênio, amino, amino substituído, carboxila, carboalcóxi, carboxamida, ciano, e sulfonato. Os pares de grupos adjacentes, por exemplo, R^4-R^8 ou R^8-R^6 , podem ser ligados uns aos outros para formar um sistema de anel carbocíclico ou heterocíclico compreendendo pelo menos um anel de 5 ou 6 membros que é fundido ao anel ao qual os dois grupos estão presos. Tais anéis heterocíclicos fundidos podem conter os átomos N, O ou S e podem conter os substituintes de anel exceto H tais como aqueles mencionados acima. Um ou mais dos grupos R^4-R^{11} podem

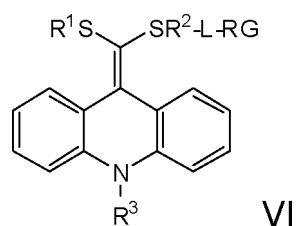
ser um substituinte de rotulação da fórmula -L-RG. Em uma modalidade R⁴-R¹¹ são selecionados de grupos hidrogênio, halogênio e alcóxi tais como metóxi, etóxi, t-butóxi e similares. Em outra modalidade um grupo de compostos tem um dos R⁸, R⁶, R⁹ ou R¹⁰ como um halogênio e o outro de R⁴-R¹¹ são átomos de hidrogênio.

[000109] Os grupos substituintes podem ser incorporados em várias quantidades e em anel selecionado ou posições de cadeia no anel acridan para modificar as propriedades do composto ou para fornecer conveniência de síntese. Tais propriedades incluem, por exemplo, produto de quantum de quimioluminescência, taxa de reação com a enzima, intensidade de luz máxima, duração de emissão de luz, comprimento de onda de emissão de luz e solubilidade no meio de reação. Os substituintes específicos e seus efeitos são ilustrados nos exemplos específicos abaixo, que, entretanto, não devem ser considerados limitantes do escopo da descrição de modo algum. Para synthetic expediency os compostos da fórmula I desejavelmente têm cada de R⁴ a R¹¹ como um átomo de hidrogênio atom.

[000110] Em outra modalidade, um grupo de compostos tem a fórmula V sendo que cada de R⁴ a R¹¹ é hidrogênio. Os grupos R¹, R² e R³ são como definidos acima.



[000111] Os compostos de rotulação das fórmulas IV ou V têm os grupos -L-RG como um substituinte no grupo R¹ ou R². Em uma modalidade um composto de rotulação tem a fórmula VI.



[000112] Os compostos de rotulação representativos têm as estruturas abaixo. Os compostos exemplares adicionais e seus usos na união a outras moléculas e superfícies sólidas são descritos os exemplos específicos abaixo. As estruturas mostradas abaixo ilustram compostos exemplares da fórmula CL-L-RG.

Tabela 8

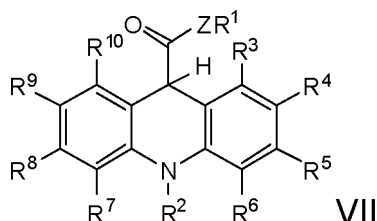
<p style="text-align: center;">AK1</p>	<p style="text-align: center;">AK2</p>
<p style="text-align: center;">AK3</p>	<p style="text-align: center;">AK4</p>
<p style="text-align: center;">AK5</p>	<p style="text-align: center;">AK6</p>
<p style="text-align: center;">AK7</p>	

[000113] Os compostos de AK específicos acima e compostos das

fórmulas gerais IV, V e VI mostrados acima podem ser preparados pelo químico orgânico versado utilizando os métodos geralmente conhecidos incluindo métodos descritos no pedido publicado US2007/0172878. Em um método exemplar um composto de anel de acridan substituído por N e opcionalmente substituído pelo anel é reagido com uma base forte seguido por CS₂ para formar um ditiocarboxilato de acridan. O ditiocarboxilato é esterificado por métodos convencionais para instalar um dos substituintes designados R¹. O ditioéster de acridan resultante é novamente desprotonado com uma base forte tal como n-BuLi ou NaH em um solvente aprótico e S-alquilado com um reagente adequado contendo um grupo de saída e uma porção R². Será facilmente evidente para alguém de experiência ordinária em química orgânica que a porção R² possa ser submetida à outra manipulação para instalar grupos reativos adequados.

[000114] Outra classe de porções quimioluminescentes inclui ésteres de acridan, tio ésteres e sulfonamidas descritas nas Patentes dos Estados Unidos Nos. 5.491.072; 5.523.212; 5.593.845; e 6.030.803. Os compostos de quimioluminescência de rótulo nesta classe têm uma porção quimioluminescente CL da fórmula VII abaixo sendo que Z é O, S ou NR¹¹SO₂Ar, sendo que R¹¹ é alquila ou arila, sendo que Ar é arila ou arila substituída por alquila, sendo que R¹ é C₁₋₈ alquila, C₁₋₈ alquila substituída por grupos halo, aralquila, arila, ou arila substituída com alquila, alquenila, alquinila, aralquila, arila, alcóxi, alcoxialquila, halogênio, carbonila, carboxila, carboxamida, ciano, trifluorometila, trialquilamônio, nitro, hidróxi, amino e mercapto, sendo que R² é selecionado de grupos alquila, heteroalquila, arila, e aralquila, e sendo que R³⁻¹⁰ são cada hidrogênio ou 1 ou 2 substituintes são selecionados de alquila, alcóxi, hidróxi, e halogênio, o restante de R³⁻¹⁰ é hidrogênio. Em uma modalidade cada de R³⁻¹⁰ é hidrogênio e R¹ é um substituinte de rotulação. Em outra modalidade um de R³⁻¹⁰ é um substituinte de

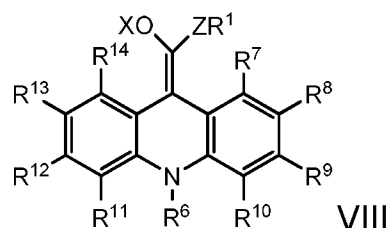
rotulação e os outros de R³⁻¹⁰ são hidrogênio.



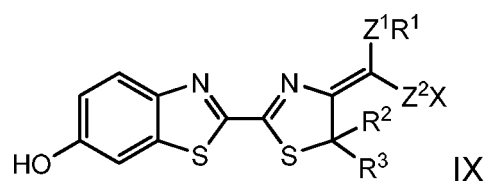
[000115] Outra classe de porções quimioluminescentes inclui os compostos heterocíclicos descritos nas Patentes dos Estados Unidos Nos. 5.922.558; 6.696.569; e 6.891.057. Em uma modalidade os compostos compreendem um anel heterocíclico, compreendendo um grupo de anel múltiplo ou de anel de cinco ou seis membros contendo nitrogênio, oxigênio ou enxofre ao qual é ligada uma ligação dupla exocíclica, o carbono terminal do qual é substituído com dois átomos selecionados de átomos de oxigênio, e enxofre.

[000116] Em outra modalidade, os compostos de quimioluminescência de rótulo compreendem um derivado de enol de acridan quimioluminescente da fórmula VIII abaixo sendo que R¹ é selecionado de grupos alquila, alquenila, alquinila, arila, e aralquila de 1-20 átomos de carbono quaisquer dos quais podem ser substituídos com 1-3 grupos selecionados de grupos carbonila, grupos carboxila, grupos tri(C₁-C₈ alquil)silila, um grupo SO₃⁻, um grupo OSO₃⁻², grupos glicosila, um grupo PO₃⁻, um grupo OPO₃⁻², átomos de halogênio, um grupo hidroxila, um grupo tiol, grupos amino, grupos de amônio quaternário, ou grupos de fosfônio quaternário, sendo que X é selecionado de grupos C₁-C₈ alquila, arila, aralquila, grupos alquila ou aril carboxila tendo de 1-20 átomos de carbono, grupos tri(C₁-C₈ alquil)silila, um grupo SO₃⁻, grupos glicosila e fosforila da fórmula PO(OR')(OR'') sendo que R' e R'' são independentemente selecionados de grupos C₁-C₈ alquila, cianoalquila, arila e aralquila, trialquilsilila, cátions de metal de álcali, cátions alcalinoterrosos, cátions de trialquilsililfosfônio e amônio, sendo que Z é selecionado de átomos O

e S, sendo que R⁶ é selecionado de grupos C₁-C₄ alquila substituída ou não substituída, fenila, benzila, alcoxialquila e carboxialquila, sendo que R⁷⁻¹⁴ são cada hidrogênio ou 1 ou 2 substituintes são selecionados de alquila, alcóxi, hidróxi, e halogênio e o restante de R⁷⁻¹⁴ é hidrogênio. Em uma modalidade cada de R⁷⁻¹⁴ é hidrogênio e R¹ é um substituinte de rotulação. Em outra modalidade um de R⁷⁻¹⁴ é um substituinte de rotulação e os outros de R⁷⁻¹⁴ são hidrogênio.



[000117] Em outra modalidade, os compostos de quimioluminescência de rótulo compreendem um composto quimioluminescente da fórmula IX abaixo sendo que R¹ é selecionado de grupos alquila, alquenila, alquinila, arila, e aralquila de 1-20 átomos de carbono quaisquer dos quais podem ser substituídos com 1-3 grupos selecionados de grupos carbonila, grupos carboxila, grupos tri(C₁-C₈ alquil)silila, um grupo SO₃⁻, um grupo OSO₃⁻², grupos glicosila, um grupo PO₃⁻, um grupo OPO₃⁻², átomos de halogênio, um grupo hidroxila, um grupo tiol, grupos amino, grupos de amônio quaternário, ou grupos de fosfônio quaternário, sendo que X é selecionado de grupos C₁-C₈ alquila, arila, aralquila, alquila ou aril carboxila tendo de 1-20 átomos de carbono, grupos tri(C₁-C₈ alquil)silila, um grupo SO₃⁻, grupos glicosila e grupos fosforila da fórmula PO(OR')(OR'') sendo que R' e R'' são independentemente selecionados de grupos C₁-C₈ alquila, cianoalquila, arila e aralquila, grupos trialquilsilila, cátions de metal de álcali, cátions alcalinoterrosos, cátion de amônio e trialquifosfônio, sendo que Z¹ e Z² são cada selecionado de átomos O e S e sendo que R² e R³ são independentemente selecionados de hidrogênio e C₁-C₈ alquila.



[000118] Grupo de ligação (L). O grupo de ligação em quaisquer dos compostos quimioluminescentes utilizados na presente descrição pode ser uma ligação, um átomo, grupos divalentes e grupos polivalentes, ou uma cadeia linear ou ramificada de átomos alguns dos quais podem ser parte de uma estrutura de anel. O substituinte geralmente contém de 1 a cerca de 50 átomos de não hidrogênio, mais geralmente de 1 a cerca de 30 átomos de não hidrogênio. Em outra modalidade os átomos compreendendo a cadeia são selecionados de átomos C, O, N, S, P, Si, B, e Se. Em outra modalidade os átomos compreendendo a cadeia são selecionados de átomos C, O, N, P e S. O número de átomos exceto carbono na cadeia é normalmente de 0-10. Os átomos de halogênio podem estar presentes como substituintes na cadeia ou anel. Os grupos funcionais típicos compreendendo o substituinte de ligação incluem alquilenos, arílenos, alquênílenos, éteres, peróxidos, carbonilas como um grupo cetona, éster, éster de carbonato, tioéster, ou amida, grupos amina, amidina, carbamato, ureia, imina, imida, imidato, carbodiimida, hidrazino, diazo, fosfodiéster, fosfotriéster, éster de fosfonato, tioéter, dissulfeto, sulfóxido, sulfona, éster de sulfonato, éster de sulfato, e tioureia. Em outra modalidade o grupo é uma cadeia de alquilenos de 1-20 átomos terminando em um grupo -CH₂-, -O-, -S-, -NH-, -NR-, -SiO-, -C(=O)-, -OC(=O)-, -C(=O)O-, -SC(=O)-, -C(=O)S-, -NRC(=O)-, -NRC(=S)-, ou -C(=O)NR-, sendo que R é C₁₋₈ alquila. Em outra modalidade o grupo de ligação é uma cadeia poli(alquilenos-óxi) de 3-30 átomos terminando em um grupo -CH₂-, -O-, -S-, -NH-, -NR-, -SiO-, -C(=O)-, -OC(=O)-, -C(=O)O-, -SC(=O)-, -C(=O)S-, -NRC(=O)-, -NRC(=S)-, ou -C(=O)NR-, sendo que R é C₁₋₈ alquila.

[000119] Grupo Reativo. O grupo reativo RG é um átomo ou grupo

cuja presença facilita a ligação a outra molécula por ligação covalente ou forças físicas. Em algumas modalidades, a união de um composto de quimioluminescência de rótulo da presente descrição a outro composto ou substância envolverá a perda de um ou mais átomos do grupo reativo, por exemplo, quando o grupo reativo é um grupo de saída tal como um átomo de halogênio ou um grupo tosilato e o composto de quimioluminescência de rótulo é covalentemente preso a outro composto por uma reação de deslocamento nucleofílico.

[000120] Em uma modalidade, RG é um grupo de éster de N-hidroxissucinimida (NHS). O técnico versado facilmente entenderá que um substância a ser rotulada com um tal composto de rotulação compreendendo um grupo éster NHS reagirá com uma porção na substância, tipicamente um grupo amina, no processo dividindo a ligação de C-O de éster, liberando N-hidroxissucinimida e formando uma nova ligação entre um átomo da substância (N se um grupo amina) e o carbono de carbonila do composto de rotulação. Em outra modalidade RG é uma porção de hidrazina, $-NHNH_2$. Como é conhecido na técnica este grupo reage com um grupo carbonila em uma substância a ser rotulada para formar uma ligação de hidrazida.

[000121] Em outras modalidades, a ligação de um composto de quimioluminescência de rótulo a outro composto por formação de ligação covalente envolverá a reorganização de ligações no grupo reativo quando ocorre em uma reação de adição tal como uma adição de Michael ou quando o grupo reativo é um grupo isocianato ou isotiocianato. Em ainda outras modalidades, a ligação não envolverá a formação de ligação covalente, porém de preferência forças físicas em cujo caso o grupo reativo continua inalterado. Por forças físicas são entendidas forças atrativas tais como ligação de hidrogênio, atração eletrostática ou iônica, a atração hidrofóbica tal como empilhamento de base, e interações de afinidade específicas tais como interações de

biotina-estreptavidina, antígeno-anticorpo e nucleotídeo-nucleotídeo.

[000122] Os grupos reativos para ligação química de rótulos a moléculas orgânicas e biológicas incluem, porém não estão limitados aos seguintes: a) Grupos reativos de amina: $-N=C=S$, $-SO_2Cl$, $-N=C=O$, $-SO_2CH_2CF_3$; b) Grupos reativos de tiol: $-S-S-R$; c) Grupos reativos de ácido carboxílico: $-NH_2$, $-OH$, $-SH$, $-NHNH_2$; d) Grupos reativos de hidroxila: $-N=C=S$, $-N=C=O$, $-SO_2Cl$, $-SO_2CH_2CF_3$; e) grupos reativos de aldeído/cetona: $-NH_2$, $-ONH_2$, $-NHNH_2$; e f) Outros grupos reativos, por exemplo, $R-N_3$, $R-C\equiv CH$.

[000123] Em uma modalidade, os grupos reativos incluem grupos OH , NH_2 , ONH_2 , $NHNH_2$, $COOH$, $SO_2CH_2CF_3$, éster N-hidroxissuccinimida, éter N-hidroxissuccinimida e maleimida.

[000124] Os reagentes de acoplamento bifuncionais também podem ser utilizados para acoplar rótulos às moléculas orgânicas e biológicas com grupos moderadamente reativos (veja, L. J. Kricka, Ligand-Binder Assays, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1985, pp. 18-20, Table 2.2 e T. H. Ji, "Bifunctional Reagents," Methods in Enzymology, 91, 580-609 (1983)). Há dois tipos de reagentes bifuncionais: aqueles que se tornam incorporados na estrutura final, e aqueles que não fazem e servem somente para acoplar os dois reagentes.

Soluções aquosas

[000125] As soluções aquosas adequadas para uso na presente descrição são geralmente soluções contendo mais do que 50% de água. As soluções aquosas descritas aqui são adequadas para usos incluindo mistura de reação, diluição de amostra, soluções de calibrador, soluções de sbp rotulado por quimioluminescente, soluções de sbp rotulado por ativador, soluções de realçador, e solução ativadora, ou soluções concentradas de um ou mais de: sbp rotulado por quimioluminescente, sbp rotulado por ativador, realçador, ativador, amostra, e/ou agentes de inibição de sinal seletivos. Em muitas

modalidades, as soluções aquosas são soluções de tampão aquosas. Os tampões aquosos adequados incluem quaisquer dos tampões geralmente utilizados capazes de manter um ambiente em solução aquosa mantendo a solubilidade do analito, mantendo a solubilidade do reagente, e permitindo que a reação quimioluminescente prossiga. Os tampões exemplares incluem fosfato, borato, acetato, carbonato, tris(hidróxi-metilamino)metano (tris), glicina, tricina, 2-amino-2-metil-1-propanol, dietanolamina MOPS, HEPES, MES e similares. Tipicamente as soluções aquosas para uso de acordo com a presente descrição terão um pH na faixa de cerca de 5 a cerca de 10,5.

[000126] As soluções aquosas adequadas podem incluir um ou mais dos seguintes componentes adicionais: sais, tampões biológicos, álcoois, incluindo etanol, metanol, glicóis, e detergentes. Em algumas modalidades, as soluções aquosas incluem Soluções aquosas tamponadas Tris, tais como Tampão II (Salina tamponada TRIS, tensoativo, <0,1% de azida de sódio, e 0,1% de ProClin® 300 (Rohm e Haas) disponível comercialmente a partir de Beckman Coulter, Inc., Brea CA,).

[000127] Em algumas modalidades, uma solução aquosa emulando soro humano é utilizada. Uma tal matriz sintética é PBS a 20mM, 7% de BSA, pH 7,5 com 0,1% de ProClin® 300. As matrizes sintéticas podem ser utilizadas para, porém não limitadas à diluição de amostra, soluções de calibrador, sbp rotulado por soluções quimioluminescentes, soluções de sbp rotulado por ativador, soluções de realçador, e soluções ativadoras. O termo "PBS" refere-se no sentido usual a salina tamponada por fosfato, como conhecido na técnica. O termo "BSA" refere-se no sentido usual a albumina de soro bovino, como conhecido na técnica.

Formatos de Ensaio

[000128] Os formatos de ensaio requerem uma ação de ligação

específica para mediar a proximidade entre o rótulo quimioluminescente do sbp rotulado por quimioluminescente e o rótulo ativador do sbp rotulado por ativador.

[000129] Em outra modalidade, um análogo do analito é utilizado compreendendo um conjugado de análogo de ativador-analito. Em outra modalidade um analito rotulado é utilizado compreendendo um conjugado de ativador-analito. O conjugado de análogo de ativador-analito ou conjugado de ativador-analito e analito competitivamente se ligarão com o par de ligações específico para o analito. Será evidente que este tipo de método de ensaio resultará em uma correlação negativa entre a quantidade de analito na amostra e a intensidade de quimioluminescência.

[000130] Além da ligação do rótulo quimioluminescente através dos anticorpos para ligação de antígenos ou outras proteínas ou outros anticorpos através de imunoensaio, os presentes métodos podem utilizar ácidos nucleicos rotulados por quimioluminescente para detectar ácidos nucleicos através de ligação de ácidos nucleicos complementares. O uso neste respeito não é particularmente limitado com respeito ao tamanho do ácido nucleico, o único critério sendo que os pares complementares sejam de comprimento suficiente para permitir a hibridização estável. Os ácidos nucleicos como utilizado aqui incluem ácidos nucleicos de comprimento de gene, fragmentos mais curtos de ácido nucleicos, polinucleotídeos e oligonucleotídeos, quaisquer dos quais pode ser de filamento único ou duplo. Na prática da descrição utilizando ácidos nucleicos como par de ligações específico, um ácido nucleico é covalentemente preso ou fisicamente imobilizado em uma superfície de um suporte sólido para capturar um ácido nucleico do analito. O rótulo quimioluminescente pode ser preso ao ácido nucleico de captura, ou o rótulo pode ser conectado com uma substância auxiliar, também preso ao ácido nucleico de captura como

explicado acima. O ácido nucleico de captura terá complementariedade de sequência total ou substancialmente total para uma região de sequência do ácido nucleico do analito. Quando substancialmente complementar, o ácido nucleico de captura pode possuir uma porção de projeção terminal, uma porção de alça terminal ou uma porção de alça interna que não seja complementar para o analito desde que não interfira com ou previna a hibridização com o analito. A situação reversa pode também ocorrer onde a projeção ou alça reside no ácido nucleico do analito. O ácido nucleico de captura, ácido nucleico do analito, um conjugado de um ativador, e um terceiro ácido nucleico são permitidos hibridizar. O terceiro ácido nucleico é substancialmente complementar a uma região de sequência do ácido nucleico do analito diferente da região complementar ao ácido nucleico de captura. A hibridização do ácido nucleico de captura e ácido nucleico de conjugado ativador com o analito pode ser realizada consecutivamente em ordem ou simultaneamente. Como um resultado deste processo, o rótulo quimioluminescente é posto em uma configuração reativa com o ativador em virtude de reações de hibridização específicas levando o ativador para perto do rótulo quimioluminescente preso à superfície do suporte. A solução ativadora é fornecida e quimioluminescência detectada como descrito acima.

[000131] Outra modalidade compreende uma variação sendo que um conjugado do analito com o ativador é utilizado. O ácido nucleico do conjugado de analito-ativador e ácido nucleico do analito competitivamente se ligarão com o par de ligações específico para o ácido nucleico do analito. Será evidente que este tipo de método de ensaio resultará em uma correlação negativa entre a quantidade de analito na amostra e a intensidade de quimioluminescência.

[000132] Além dos sistemas com base em anticorpo e com base em ácido nucleico, outros pares de ligações específicos como são

geralmente conhecidos por alguém de experiência na técnica de ensaios de ligação, podem servir como a base para os métodos de teste de acordo com a presente descrição. Os pares de anticorpo-hapteno também podem ser utilizados. Os pares de fluoresceína/antifluoresceína, digoxigenina/antidigoxigenina, e nitrofenila/antinitrofenila são exemplares.

Detecção

[000133] A luz emitida pelo presente método pode ser detectada por qualquer meio conhecido adequado tal como um luminômetro, película de raios X, película fotográfica de alta velocidade, uma câmara CCD, um contador de cintilação, um actinômetro químico ou visualmente. Cada meio de detecção tem uma sensibilidade espectral diferente. O olho humano é idealmente sensível a luz verde, as câmeras CCD exibem sensibilidade máxima à luz vermelha, as películas de raios X com resposta máxima a de luz UV a azul ou luz verde estão disponíveis. A escolha do dispositivo de detecção será administrada pelo pedido e considerações de custo, conveniência, e se a criação de um registro permanente é requerida. Nestas modalidades onde o curso de tempo de emissão de luz é rápido, é vantajoso realiza a reação de ativação para produzir a quimioluminescência na presença do dispositivo de detecção. Como um exemplo, a reação de detecção pode ser realizada em um tubo de teste ou placa de microcavidade alojada em um luminômetro ou colocada em frente a uma câmara CCD em um alojamento adaptado para receber tubos de teste ou placas de microcavidade.

Usos

[000134] Os presentes métodos de ensaio encontram aplicabilidade em muitos tipos de ensaios de par de ligações específicos. Os principais entre estes são imunoensaios ligados à enzima quimioluminescente, tais como uma ELISA. Vários formatos de ensaio

e os protocolos para realizar as etapas imunoquímicas são bem conhecidos na técnica e incluem tanto os ensaios competitivos quanto os ensaios de sanduíche. Os tipos de substâncias que podem ser ensaiadas por imunoensaio de acordo com a presente descrição incluem proteínas, peptídeo, anticorpos, haptenos, fármacos, esteroides e outras substâncias que são geralmente conhecidas na técnica de imunoensaio.

[000135] Os métodos da presente descrição são também úteis para a detecção de ácido nucleicos. Em uma modalidade um método faz uso de sondas de ácido nucleico rotuladas por enzima. Os métodos exemplares incluem ensaios de hibridização de solução, detecção de DNA em manchamento do Sul, RNA por manchamento do Norte, sequenciamento de DNA, impressão digital de DNA, hibridizações de colônia e sustentações de placas, a condução dos quais é bem conhecida por aqueles de experiência na técnica.

Kits

[000136] A presente descrição também contempla o fornecimento de *kits* para realizar ensaios de acordo com os métodos da presente descrição.

[000137] Em outra modalidade da presente descrição, um kit é fornecido contendo materiais de ensaio incluindo sbp rotulado por quimioluminescente, sbp rotulado por ativador, agente de inibição de sinal seletivo, e solução ativadora. Em algumas modalidades, estes materiais de ensaio são fornecidos em solução aquosa. Em algumas modalidades, um ou mais dos materiais de ensaio são fornecidos em solução aquosa concentrada. As soluções aquosas concentradas dos materiais de ensaio são fornecidas para uma mistura de reação em volumes para alcançar a concentração final desejada de cada material de ensaio. Em algumas modalidades, a solução aquosa adicional é fornecida para diluição de soluções aquosas concentradas. Em outras

modalidades, um ou mais materiais de ensaio são fornecidos em uma forma liofilizada ou sólida. Em tais modalidades, a solução aquosa adicional pode ser fornecida para converter o material de ensaio liofilizado ou sólido em solução aquosa ou concentrado de solução aquosa.

[000138] Em algumas modalidades de kit, cada material de ensaio é fornecidos em um recipiente separador. Em outras modalidades de kit, um ou mais materiais de ensaio são fornecidos em um recipiente comum. Em ainda outras modalidades de kit, um ou mais materiais de ensaio são fornecidos em um recipiente comum dividido em cavidades sendo que cada cavidade mantém um material de ensaio.

[000139] Os kits podem compreender, em combinação embalada, rótulos quimioluminescentes como os compostos de rotulação livres, par de ligações específicos rotulado por quimioluminescente, ou substâncias auxiliares rotuladas por quimioluminescente tais como proteínas de bloqueio, junto com uma solução ativadora e instruções para uso. Os *kits* podem opcionalmente também conter conjugados ativadores, controles e calibradores de analito, diluentes e tampões de reação se quimioluminescência de rótulo tiver que ser realizada pelo usuário.

Sistemas

[000140] Os métodos de ensaio descritos na presente descrição podem ser automatizados para desempenho rápido empregando-se um sistema. Um sistema para realizar os ensaios da presente descrição requer as capacidades de manuseio de fluido para aliquotar e liberar a solução ativadora para um recipiente de reação contendo os outros reagentes e ler o sinal quimioluminescente resultante. Nas modalidades de um tal sistema, um luminômetro está posicionado próximo ao vaso de reação no momento e local da injeção de solução ativadora. Preferivelmente, o sistema de detecção incluindo

luminômetro ou outro dispositivo de detecção age de acordo com o sistema de manuseio de fluido injetando a solução ativadora. Adicionalmente, um sistema automatizado para realizar os ensaios da presente descrição em capacidades de manuseio de fluido para aliquotar e liberar os outros reagentes e amostra para um vaso de reação. Em uma modalidade, um sistema para realizar o método de ensaio da presente invenção inclui um sistema de manuseio de fluido para liberação da amostra na mistura de reação, um sistema de manuseio de fluido para liberação de um par de ligações específico rotulado por quimioluminescente, um par de ligações específico rotulado por ativador, agente de inibição de sinal seletivo na mistura de reação, e um sistema de manuseio de fluido para liberação de solução ativadora na mistura de reação para liberar um sinal quimioluminescente; e um sistema de detecção para detectar o sinal quimioluminescente, sendo que o um sistema de manuseio de fluido para liberação de solução ativadora age de acordo com o sistema de detecção para medir as liberações de sinal quimioluminescente em e em seguida a injeção de fluido ativador. Estes sistemas de manuseio de fluido podem ser o mesmo sistema ou sistemas diferentes dependendo da configuração do sistema.

[000141] Um instrumento DXI 800 modificado foi modificado para realizar os métodos de ensaio da presente descrição. Outra descrição do instrumento DXI 800 sem modificação está disponível no Guia do Usuário UniCel DXI, ©2007, Beckman Coulter, aqui incorporado por referência. Para uso na realização dos métodos descritos aqui, um instrumento de imunoensaio DXI® 800 foi modificado incorporando-se um luminômetro de fotocontagem (o mesmo modelo como utilizado em instrumento DXI 800 comercialmente disponível) posicionado para detecção próxima do local do (aproximadamente 19mm de) vaso de reação durante e imediatamente após a injeção de solução ativadora.

[000142] O sistema de liberação de substrato no imunoensaio DXI® 800 foi utilizado para liberar a solução ativadora. Alguns componentes adicionais do instrumento de imunoensaio DXI® 800 não necessários para ensaios de acordo com os métodos descritos aqui foram removidos para conveniência, por exemplo, magnetos e sistemas de aspiração utilizados para separação e lavagem necessários para imunoensaio convencional, porém, não utilizados nos métodos da presente invenção. O instrumento de imunoensaio DXI® 800 foi utilizado para conveniência na automação do manuseio do vaso de reação, pipetagem de reagentes, detecção, e forneceu o controle de temperatura a 37°C. Outra instrumentação comercialmente disponível pode ser similarmente utilizada para realizar os métodos de ensaio descritos aqui contanto que o instrumento seja capaz de ou possa ser modificado para injetar a solução ativadora em um vaso de reação e comece a detecção de sinal quimioluminescente de uma maneira concorrente ou quase concorrente. A detecção de sinal quimioluminescente pode ser de duração muito curta, vários milissegundos, tais como um ciclo de um tubo fotomultiplicador (PMT) ou pode ser prolongada durante vários segundos. Todo ou uma porção do sinal coletado pode ser utilizado para análise de dados subsequentes.

[000143] A detecção de sinal quimioluminescente pode ser de duração muito curta, vários milissegundos, tal como um ciclo de um tubo fotomultiplicador (PMT) ou pode ser prolongada durante vários segundos. Todo ou uma porção do sinal coletado pode ser utilizado para análise de dados subsequente. Por exemplo, em um procedimento típico descrito abaixo, a intensidade de luz é somada durante 0,25 sec, centralizada no *flash* de luz, em outros procedimentos, a intensidade de luz é somada durante 5 segundos durante o primeiro 0,5 seg. sendo uma injeção anterior atrasada.

EXEMPLOS

Glossário:

AHTL: lactona de homocisteína de N-acetila

AK: acridan

CKMB: isoenzima de creatina quinase

DMF: dimetil formamida

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

HRP: peroxidase de rábano silvestre

MS-PEG: polímero de polietileno glicol linear reativo de amina com grupos de metila terminal

Na₂EDTA: sal de sódio de ácido tetra-acético de diamina de etileno.

NHS: N-hidroxissucinimida

PEG: polietileno glicol; especificamente oligômeros ou polímeros com peso molecular < 20.000 g/mol.

PEO: óxido de polietileno; especificamente polímeros com peso molecular > 20.000 g/mol.

PMP: 1-fenil-3-metil-5-pirazolona

PSA: antígeno específico de próstata

Sulfo-SMCC: Sulfossucinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxilato

TBS: solução salina Tris-tamponada

TnI: Troponina I; cTnI é Troponina I cardíaca.

Tris: 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol, também conhecido como tris-(hidroximetil)aminometano

Tween®-20: monolaurato de sódio de polioxietileno(20); comercialmente disponível de Sigma-Aldrich, St. Louis (MO).

Materiais:

[000144] Amostras de Concentrações Conhecidas: As amostras de concentração conhecida para uso nos ensaios e métodos de ensaios descritos abaixo foram tipicamente preparadas adicionando-se proteína

purificada do analito designado ao soro humano livre daquele analito. Por exemplo, as amostras de PSA de proteína se PSA conhecida foram preparadas reforçando-se o PSA derivado de fluido seminal humano em soro de fêmeas livre de PSA para alcançar a concentração de PSA declarada nas tabelas apresentadas nos exemplos abaixo. As amostras, se armazenadas antes do uso, foram armazenadas a 4 C ou congeladas e descongeladas antes do uso. As amostras de concentração conhecida foram geralmente preparadas como foi de costume para conjuntos de calibração úteis para geração de uma curva padrão a ser utilizada em combinação com os métodos de ensaio para determinar a concentração de analito nas amostras de concentração de analito desconhecida.

[000145] Solução ativadora incluindo Realçador: Uma solução ativadora aquosa utilizada em muitos dos exemplos abaixo, é referida como Solução ativadora A. A solução ativadora A contém ácido p-hidroxicinâmico a 8mM, Na₂EDTA a 1 mM, Peróxido de ureia a 105 mM, e 0,2% de Tween®-20 em uma solução de tampão aquosa de Tris a 25 mM em pH 8,0 com aproximadamente 3% de etanol. Todos os componentes são comercialmente disponíveis de vários fornecedores, tal como Sigma, St. Louis, MO.

[000146] Tampão II: (Salina tamponada TRIS, tensoativo, <0,1% de azida de sódio, e 0,1% de ProClin ® 300 (Rohm e Haas) disponível comercialmente de Beckman Coulter, Inc., Brea CA,).

Instrumentos:

[000147] Instrumento de Imunoensaio Dxl® 800 Modificado (Beckman Coulter, Inc. Brea, CA): Um instrumento DXI® 800 modificado foi utilizado para realizar os métodos de ensaio descritos em vários exemplos abaixo onde notado. Para uso na realização dos métodos descritos aqui, um instrumento DXI® 800 foi modificado incorporando-se um luminômetro de fotocontagem (o mesmo modelo

como utilizado no instrumento DXI® 800 comercialmente disponível) posicionado para detecção próximo do local do (aproximadamente 19mm de) vaso de reação durante e imediatamente após a injeção de solução ativadora. O sistema de liberação de substrato no imunoensaio de DXI® 800 foi utilizado para liberar a solução ativadora. Alguns componentes adicionais do instrumento de imunoensaio DXI® 800 não necessários para ensaios de acordo com os métodos descritos aqui foram removidos para conveniência, por exemplo, magnetos e sistema de aspiração utilizados para separação e lavagem necessários para imunoensaio convencional, porém, não utilizado nos métodos da presente invenção. O instrumento de imunoensaio DXI® 800 modificado foi utilizado para conveniência na automação do manuseio do vaso de reação, pipetagem dos reagentes, detecção, e forneceu controle de temperatura a 37°C. Outra instrumentação comercialmente disponível pode ser similarmente utilizada para realizar os métodos de ensaio descritos aqui contanto que o instrumento seja capaz de ou possa ser modificado para injetar a solução ativadora em um vaso de reação e começa a detecção de sinal quimioluminescente de uma maneira concorrente ou quase concorrente. Outros instrumentos de exemplo são listados abaixo.

[000148] A detecção de sinal quimioluminescente pode ser de duração muito curta, vários milissegundos, tal como um ciclo de um tubo fotomultiplicador (PMT) ou pode ser prolongada durante vários segundos. Todo ou uma porção do sinal coletado pode ser utilizado para análise de dados subsequente.

[000149] Luminômetro de placa Luminoskan Ascent®, (Thermo Fischer Scientific, Inc., Waltham, MA). Não Modificado. Métodos realizados em temperatura ambiente.

[000150] Luminômetro de microplaca SpectraMax® L, (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) Não modificado. Métodos realizados em

temperatura ambiente utilizando o modo cinético de leitura rápida.

Exemplo 1. Avaliação dos compostos quanto à eficácia como SSIA

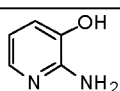
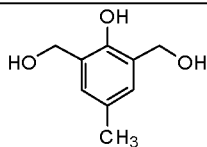
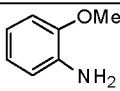
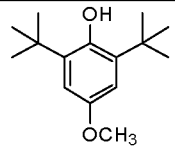
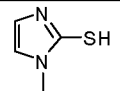
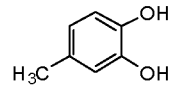
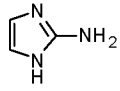
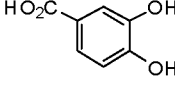
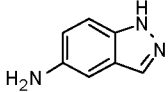
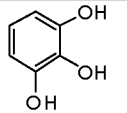
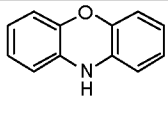
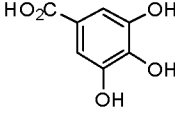
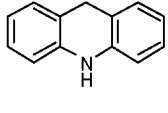
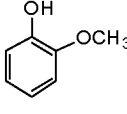
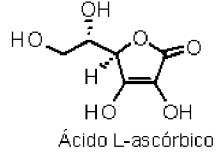
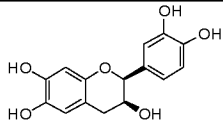
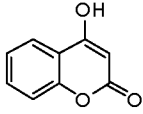
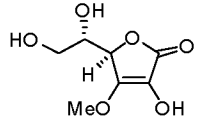
A. Avaliação de SSIA por Imunoensaio de PSA Homogêneo

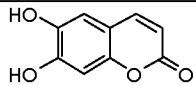
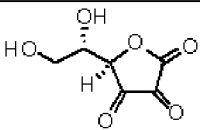
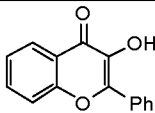
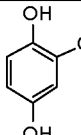
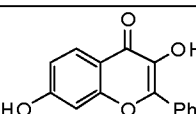
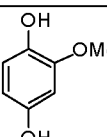
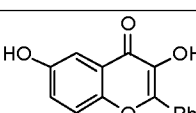
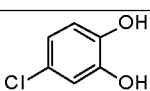
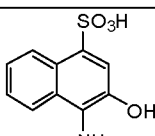
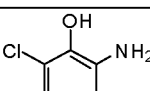
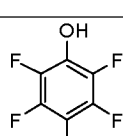
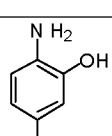
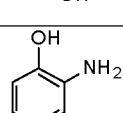
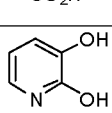
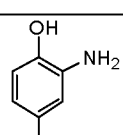
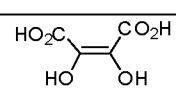
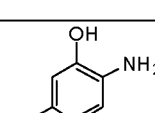
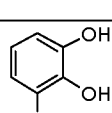
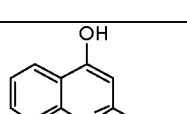
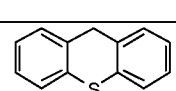
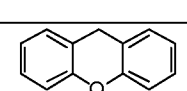
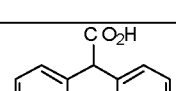
[000151] Este exemplo apresenta um método utilizado para testar compostos candidatos quanto à funcionalidade como SSIA em ensaios da presente descrição. O teste foi conduzido em um imunoensaio de avaliação de modelo da proteína PSA. Os testes foram executados utilizando um formato de placa de microtítulo de 96 cavidades. Uma solução contendo 30 µL de anti-PSA-AK1 de camundongo (66 ng), 30 µL de conjugado anti-PSA-HRP de camundongo (7,8 ng), 36 µL de soro feminino humano, e 24 µL de calibrador de PSA foram pipetados em cada cavidade. A placa foi incubada a 37°C durante 10 minutos. Uma alíquota de 5 µL do composto de teste (várias concentrações) foi adicionada a cada cavidade. A quimioluminescência foi ativada pela adição de 100 µL de uma solução ativadora cuja composição é listada abaixo. O *flash* quimioluminescente foi integrado durante 5 segundos após a adição da solução ativadora utilizando um luminômetro de placa Luminoskan Asent®, (Thermo Fischer Scientific, Inc., Waltham, MA).

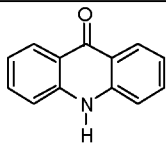
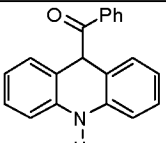
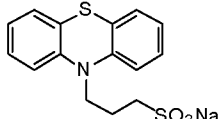
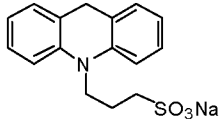
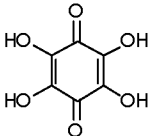
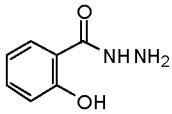
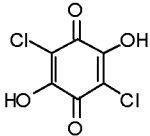
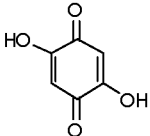
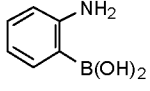
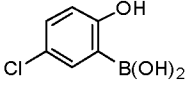
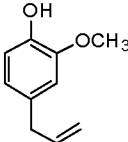
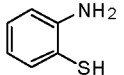
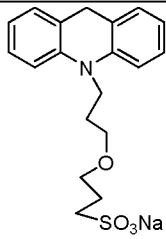
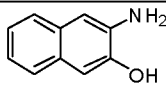
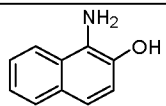
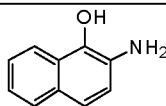
[000152] Cada composto candidato foi testado pelo menos dois níveis de PSA: zero e 129 ng de PSA/mL (calibrador S5) e/ou 2 ng de PSA/mL (calibrador S2). Para brevidade somente os resultados de uma concentração representativa de cada composto candidato são apresentados. Os compostos são considerados serem eficazes na melhora do desempenho de ensaio se S5/S0 for melhorado em relação a um controle. É desejável que o fator de melhora seja pelo menos 2 ($S5/S0 \geq$ cerca de 20-30) e mais desejável que o fator de melhora seja pelo menos 5 ($S5/S0 \geq$ cerca de 50), ainda mais desejável que S5/S0 seja ≥ 100 na presente avaliação. Descobriu-se que muitos compostos exibiram eficácia como SSIA neste teste de

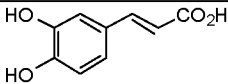
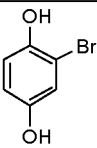
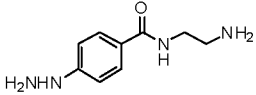
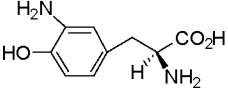
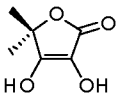
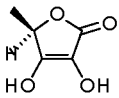
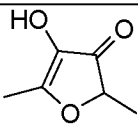
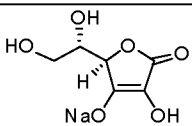
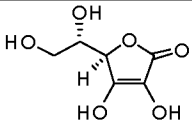
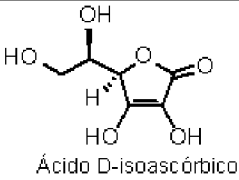
avaliação, descobriu-se que outros são ineficazes ou têm efeito limitado.

Tabela 9: Composto de teste, concentração final e S5/S0

Composto de Teste	Conc.	S5/S0	Composto de teste	Conc.	S5/S0
Controle (Soro)		5-10		0,122 mM	32
	0,122 mM	23		0,122 mM	7
	0,122 mM	19		36,7 mM	102
	0,122 mM	142		24,4 mM	14
	0,122 mM	178		12,2 mM	10
	0,122 mM	69		0,122 mM	605
	0,122 mM	135		0,122 mM	120
	0,122 mM	13	 Ácido L-ascórbico	0,122 mM	423
	0,122 mM	323	Sal de sódio de ascorbato (ânion de ascorbato)	0,122 mM	495
	0,122 mM	17	 MeO	122 uM	16

Composto de Teste	Conc.	S5/S0	Composto de teste	Conc.	S5/S0
	0,122 mM	105	 Ácido desidroascórbico	0,122 mM	26
	0,122 mM	13		0,111 mM	229
	0,122 mM	14		0,111 mM	161
	0,122 mM	9		0,244 mM	409
	0,122 mM	65		0,244 mM	300
	0,014 mM	50		0,122 mM	153
	0,122 mM	649		0,122 mM	41
	0,244 mM	205		0,122 mM	30
	0,030 mM	161		0,122 mM	22
	0,122 mM	6		0,122 mM	9
	0,122 mM	4		0,122 mM	7

Composto de Teste	Conc.	S5/S0	Composto de teste	Conc.	S5/S0
	0,122 mM	14		0,122 mM	9
	0,244 mM	50		0,244 mM	15
	0,061 mM	51		0,061 mM	23
	0,031 mM	7		0,244 mM	14
	0,122 mM	108		0,244 mM	22
	0,244 mM	30		0,122 mM	234
Glutaciona	122 uM	77	DTT	72 uM	20
L-Cisteína	122 uM	22	NH ₂ NH ₂	244 uM	15
NaN ₃	34 uM	19	Na ₂ SO ₃	15 uM	59
TMB	61 uM	20	Etileno glicol	122 uM	14
	0,244 mM	6		0,244 mM	67
	0,122 mM	63		0,244 mM	109

Composto de Teste	Conc.	S5/S0	Composto de teste	Conc.	S5/S0
	0,122 mM	116		0,122 mM	570
	1,22 mM	138		0,244 mM	448
	0,122 mM	467		0,122 mM	423
	1,25 mM	237		122 µM	9,2
	122 µM	10,3		122 µM	10,3

B. Sistema de Modelo para Seleção de Agente de Inibição de Sinal Seletivo Eficaz (SSIA)

[000153] Um sistema de modelo foi também desenvolvido e empregado para avaliar e selecionar os compostos com características para funcionar como agente de inibição de sinal seletivo em ensaios da presente descrição. O sistema modelo usa uma micropartícula conjugada para BSA (albumina de soro bovino) rotulado com um rótulo quimioluminescente de estreptavidina e cetenoitioacetal de acridan (AK1) como o sbp rotulado por quimioluminescente, e HRP biotinilado como o par de ligações específico rotulado por ativador. No sistema de modelo, a variação de quantidades de Btn-HRP é adicionada ao par de ligações específico rotulado por quimioluminescente em 0, 1, 10, 100 e 250 ng/mL. HRP não rotulado adicional é adicionado para alcançar um HRP total de concentração de 500 ng/mL em cada mistura de reação. O HRP não rotulado em combinação com o sbp rotulado por ativador foi fornecido para as micropartículas de sbp

rotulado por quimioluminescente para emular a amostra. Um composto para avaliar como um SSIA foi também adicionado. Esta mistura de reação do sistema de modelo é em seguida ativada por adição da solução ativadora de uma forma de ensaios da presente descrição.

C. Preparação de materiais para sistema de modelo:

[000154] Para preparar o sbp rotulado por quimioluminescente em micropartículas, Albumina de soro bovino (BSA) foi biotinizada com 4X de excesso molar de biotina-LC-sulfoNHS (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA). Os reagentes não ligados foram removidos através de dessalinização ou diálise. A biotina-BSA foi em seguida reagida com um excesso molar de 5x de um éster de NHS de cetenoditioacetil de acridan AK1 em fosfato de sódio a 20mM pH 7,2 : DMSO 75:25, v/v) seguido por dessalinização no mesmo tampão. O BSA dual rotulado (biotina e AK1) foi em seguida acoplado com micropartículas M280 ativado de tosila (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) em um tampão de borato a 0,1M pH 9,5 em uma concentração de cerca de 20 µg de BSA rotulado por mg de micropartículas durante 16-24 h a 40°C. Após acoplamento das micropartículas terem sido extraídos durante 1 h a 40°C com base TRIS a 0,2 M, 2% de SDS, pH ~ 11. O processo de extração foi repetido mais uma vez. As micropartículas foram em seguida suspensas em um tampão TRIS de BSA/Salina tamponada a 0,1% TRIS (BSA/TBS) e estreptavidina (SA) foi adicionado em aproximadamente 15 µg de SA por mg de micropartículas. A estreptavidina foi misturada com as micropartículas durante 45-50 min em temperatura ambiente. As micropartículas foram em seguida lavadas três vezes e suspensas no mesmo BSA/TBS. A carga destas micropartículas é 5 µg de proteína biotinizada por mg de micropartículas.

[000155] HRP, (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) foi biotinizado com 4X de excesso molar de biotina-LC-sulfoNHS (Pierce

Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA). Alternativamente, 25X de excesso molar de biotina-PEO4- NHS pode ser utilizado. Os reagentes não ligados foram removidos através de dessalinização ou diálise.

[000156] Cada composto SSIA para avaliação foi solubilizado em Tampão II em uma concentração de pelo menos 10X da concentração de força de trabalho.

D. Procedimento de teste utilizando o sistema de modelo

[000157] 25 µl de 1mg/ml de partículas M280 de BSA dual-rotulado (biotina e AK1) foram misturados com 45µl de SSIA de concentração de trabalho no Tampão II. O volume de ensaio levado para 85 µl por adição de 15µl de Tampão II. 15µl de amostra contendo Btn-HRP:HRP em relações diferentes (A quantidade de HRP biotinilado variou de 0, 1, 10, 100 e 250 ng/mL) foi adicionada. A mistura de reação foi incubada durante 30 min a 37°C, em seguida 100 µL de solução ativadora foram adicionados e a intensidade de luz registrada. O volume total da mistura de reação, incluindo solução ativadora foi 200 µL com uma concentração final de 100 µM de SSIA.

Tabela 10

	Composto testado quanto à eficácia como SSIA			
	Controle de Tampão II	2-amino fenol	ácido 4-Amino-3-hidróxi-benzoico	cloridrato 4-aminorressorcinol
BTN-HRP0	15.901	65	972	675
BTN-HRP1	46.464	356	2.808	1.163
BTN-HRP10	2.035.193	8.632	441.455	74.764
BTN-HRP100	5.755.341	2.092.703	5.906.521	330.056
BTN-HRP250	6.255.297	4.008.689	6.403.425	259.541
S/S0	1,0	1,0	1,0	1,0
S1/S0	2,9	5,5	2,9	1,7
S2/S0	128,0	132,8	454,2	110,8
S3/S0	361,9	32195,4	6076,7	489,0
S4/S0	393,4	61672,1	6587,9	384,5

	Controle de Tampão II	Catecol de 4-cloro	2-cloro-1,4-dihidroxibenzeno	Ácido Ascórbico
BTN-HRP0	16.161	93	3.571	97
BTN-HRP1	43.300	205	4.007	757
BTN-HRP10	1.769.373	1.373	188.920	16.641
BTN-HRP100	6.027.591	456.707	610.053	3.692.291
BTN-HRP250	6.162.340	1.260.937	875.831	6.036.145
S/S0	1,0	1,0	1,0	1,0
S1/S0	2,7	2,2	1,1	7,8
S2/S0	109,5	14,8	52,9	171,6
S3/S0	373,0	4910,8	170,8	38064,9
S4/S0	381,3	13558,5	245,3	62228,3

Tabela 11

	Controle de Tampão II	Trolox®	Ácido ascórbico	palmitato de ácido 6-ascórbico	ácido 5,6 iso-propileno ascórbico	(+/-)-alfa-Tocoferol	(+)-gama-Tocoferol	Ácido Úrico
BTN-HRP0	23.603	173	151	81	264	2.772	6.051	5.532
BTN-HRP1	45.016	1.460	995	327	961	6.468	10.924	9.760
BTN-HRP10	2.149.712	37.291	32.568	40.863	29.645	1.253.187	1.686.079	1.025.209
BTN-HRP100	8.926.151	7.251.008	4.553.473	8.187.204	4.917.499	8.560.469	8.698.069	8.712.328
BTN-HRP250	9.660.668	10.794.247	8.915.869	10.182.411	8.784.595	9.628.184	10.282.504	10.708.733
S/S0	1	1	1	1	1	1	1	1
S1/S0	1,9	8,4	6,6	4	3,6	2,3	1,8	1,8
S2/S0	91,1	215,1	216,2	502,4	112,3	452,1	278,7	185,3
S3/S0	378,2	41832,7	30222,2	100662,3	18626,9	3088,2	1437,5	1574,9
S4/S0	409,3	62274,5	59176,1	125193,6	33275	3473,4	1699,4	1935,8
	Controle de Tampão II	Ácido Ferúlico	Ácido Siríngico	G.W.7.35				
BTN-HRP0	27.659	5.252	14.485	67.556				
BTN-HRP1	56.887	12.079	23.707	92.403				
BTN-HRP10	1.929.315	715.313	939.372	1.600.767				
BTN-HRP100	8.598.556	8.785.865	7.927.096	7.938.477				
BTN-HRP250	9.255.947	10.244.269	9.530.979	9.509.801				

Tabela 11 (continuação)

S/S0	1	1	1	1				
S1/S0	2,1	2,3	1,6	1,4				
S2/S0	69,8	136,2	64,8	23,7				
S3/S0	310,9	1672,9	547,2	117,5				
S4/S0	334,6	1950,5	658	140,8				

Tabela 12

	Controle	Glutationa	Cisteína	Ácido Lipoico		
BTN-HRP0	30.493	26.977	35.695	35.016		
BTN-HRP1	80.841	55.719	58.203	71.751		
BTN-HRP10	2.489.892	2.480.764	2.483.411	2.450.949		
BTN-HRP100	8.931.915	8.733.068	9.147.371	8.647.037		
BTN-HRP250	9.246.768	9.965.235	10.190.505	8.847.921		
S/S0	1	1	1	1		
S1/S0	2,7	2,1	1,6	2		
S2/S0	81,7	92	69,6	70,0		
S3/S0	292,9	323,7	256,3	246,9		
S4/S0	303,2	369,4	285,5	252,7		
	Controle	Resveratrol	Melatonina	N-Ac-Cisteína	TEMPOL	Hidrazida Nicotínica
BTN-HRP0	30.108	64.051	54.528	43.647	22.621	42.260
BTN-HRP1	52.680	81.452	70.741	47.636	33.873	58.356
BTN-HRP10	2.307.964	1.073.968	2.381.361	1.757.607	1.963.369	2.106.471
BTN-HRP100	8.866.105	5.944.792	9.471.431	8.685.795	9.220.799	8.205.320
BTN-HRP250	9.055.791	6.559.359	10.370.061	10.219.869	10.578.104	7.923.092
S/S0	1	1	1	1	1	1
S1/S0	1,7	1,3	1,3	1,1	1,5	1,4
S2/S0	76,7	16,8	43,7	40,3	86,8	49,8
S3/S0	294,5	92,8	173,7	199	407,6	194,2
S4/S0	300,8	102,4	190,2	234,2	467,6	187,5

Tabela 12 (continuação)

	Controle	Toco-PEG	Acrilamida/bis- acrilamida 19:1	Acrilamida/bis- acrilamida 37,5:1	Ácido Nicotínico
BTN-HRP0	30.608	33.836	28.760	36.028	34.369
BTN-HRP1	144.936	44.180	50.829	56.267	53.765
BTN-HRP10	2.255.845	1.970.753	2.286.095	2.187.617	2.228.317
BTN-HRP100	8.581.227	8.352.891	8.216.691	8.094.544	8.772.523
BTN-HRP250	9.183.040	9.383.395	8.629.933	8.463.999	9.224.439
S/S0	1	1	1	1	1
S1/S0	1,5	1,3	1,8	1,6	1,6
S2/S0	73,7	58,2	79,5	60,7	64,8
S3/S0	280,4	246,9	285,7	224,7	255,2
S4/S0	300	277,3	300,1	234,9	268,4

[000158] Compostos demonstrando utilidade como SSIA para uso em ensaios da presente descrição incluem: Ácido ascórbico, 6-palmitato e 5,6-isopropilideno derivados de ácido ascórbico, 2-aminofenol, ácido 4-Amino-3-hidróxi-benzoico, 4-clorocatecol e TROLOX, um derivado de Tocoferol, com reduções no sinal de base indicou em comparação os valores S0 para o controle, e melhoras em sinal para ruído demonstradas aumentando-se os valores S1/S0.

[000159] Os compostos que mostraram eficácia insuficiente como SSIA's no sistema de modelo são: glutathiona, cisteína, cisteína de N-acetila, ácido lipoico (um dissulfeto), tocoferol pegilado, melatonina (um derivado de triptamina), TEMPOL (um nitróxido estável), hidrazida nicotínica, ácido nicotínico, Resveratrol e duas soluções de acrilamida/bis-acrilamida. Um segundo agrupamento de compostos, incluindo alfa e gama-Tocoferol, ácido úrico, e ácido ferúlico mostraram uma redução em sinal S0 na faixa de 75-88%, porém não mostrou um aumento em S/S0 até o terceiro nível cal em 10 ng/mL de Btn-HRP.

[000160] Os testes de avaliação foram realizados utilizando um Sistema de Imunoensaio Dxl® modificado (Beckman Coulter, Inc. Brea, CA) como descrito acima.

Exemplo 2:

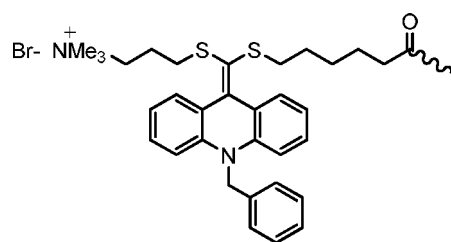
[000161] O seguinte exemplo demonstrou imunoensaio de um analito na ausência de fase sólida, tanto na presença quanto ausência de SSIA. O ensaio incluiu dois anticorpos rotulados diretos, cada dos quais tem afinidade de ligação específica para o analito, neste exemplo, Antígeno Específico de Próstata (PSA). Um anticorpo, designado "Ab1" para conveniência, é covalentemente preso a uma ou mais moléculas, tipicamente duas moléculas, de AK11. Um segundo anticorpo, designado "Ab2", é covalentemente ligado a HRP. A preparação dos materiais, desempenho do ensaio e resultados foram

como descrito abaixo.

A. Preparação de conjugado Ab1~AK

[000162] No seguinte exemplo, um éster de NHS de um composto quimioluminescente de ceteno-ditioacetato de acridan, referido aqui como AK1 (mostrado acima) é covalentemente preso a um anticorpo de antígeno específico de próstata (PSA). O seguinte método pode também ser empregado para preparar rótulos quimioluminescente de anticorpo de outros antígenos ou outros compostos quimioluminescentes de ceteno-ditioacetato de acridan.

[000163] AK1, um composto quimioluminescente de ceteno-ditioacetato de acridan reativo de amina foi preparado em DMSO em 10mM. A 3mg (6,6mg/mL) de um anticorpo PSA monoclonal em PBS, pH 7,4, um excesso molar de 10 vezes de AK1 foi adicionado e incubado no escuro durante 1 hora em temperatura ambiente. O produto foi purificado em uma coluna de dessalinização PD-10, equilibrado em PBS, pH 7,4. O produto conteve anti-PSA monoclonal covalentemente preso a AK11 (produto de reação de AK1), mostrado abaixo com ligação ao anticorpo indicado pela linha ondulada, em grupos amino disponíveis no anticorpo. As medições de absorvância em 280 e 384 nm foram utilizadas para determinar a concentração de IgG e a relação de AK11/IgG (3 AK11:1 IgG).



AK11

B. Preparação de conjugado Ab-2~HRP

[000164] No seguinte procedimento sintético representativo, a enzima peroxidase de rábano silvestre (HRP) é covalentemente presa a um anticorpo para o antígeno específico de próstata (PSA). Em seguida ao método ensinado aqui, os anticorpos rotulados por enzima

adicionais podem ser preparados.

C. Ativação de HRP

[000165] 10 mg de HRP (Roche, 10-814-393-001) foi dissolvido em 2,0 mL de 1xPBS (NaCl 137 mM, Fosfato a 10 mM, KCl a 2,7 mM, e um pH de 7,4). Um excesso molar de 30 vezes de sulfo-SMCC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) em DMSO (25 ug/uL) foi adicionado à solução de HRP e incubado no escuro durante 1 hora. O HRP ativado por maleimida foi purificado em uma coluna de dessalinização de PD-10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) em PBS, pH 7,4. A concentração de HRP foi determinada espectrofotometricamente, utilizando um coeficiente de extinção de 2,275 mL/mg-cm em 403nm.

D. Ativação de anticorpo monoclonal anti-PSA (Ab2)

[000166] Um excesso molar de 50 vezes de 2-iminotiolano (Thermo Fisher Scientific, Piscataway, NJ) foi adicionado ao anticorpo PSA monoclonal em PBS, pH 7,4 e reagiu em temperatura ambiente durante 1 hora no escuro. O anticorpo de PSA monoclonal, designado Ab2, difere de Ab1 no Exemplo 2 no sítio de ligação em PSA. O anticorpo tiolado foi purificado em uma coluna de dessalinização de PD-10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) em PBS, pH 7,4. A concentração de anticorpo foi determinada espectrofotometricamente utilizando um coeficiente de excitação de 1,4 mL/mg-cm em 280nm.

E. Preparação de Conjugado de Ab2-HRP

[000167] Um excesso de 5 vezes de HRP ativado foi adicionado à solução Ab2 ativada para criar uma mistura de reação conjugada. A mistura de reação conjugada foi incubada em um giratório em temperatura ambiente durante 2 horas no escuro. Os grupos maleimida e tiol não reagidos foram bloqueados por adições sequenciais de uma quantidade em excesso de L-cisteína e iodoacetamida (15 minutos cada etapa) à mistura de reação

conjugada. Na primeira etapa, um excesso (0,025X de volume de reação) de 50mg/mL de L-cisteína-HCl (dissolvido em PBS, pH 7,4) foi adicionado e incubado 15 minutos. Na segunda etapa, um excesso (0,04X de volume de reação) de 50mg/mL de iodoacetamida (dissolvido em PBS, pH 7,4) foi adicionado à mistura de reação junto com Borato a 50mM e, pH 8,5 (0,08X de volume de reação) e incubado durante um adicional de 15 minutos em temperatura ambiente protegido da luz. O conjugado foi purificado em uma coluna Superdex 200 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, Part N° 17-5175-01) equilibrada em PBS, pH 7,4. As frações contendo o conjugado foram agrupadas e a relação de HRP/IgG foi determinada espectrofotometricamente, como descrito em A e B. A relação de HRP/IgG calculada foi 1,4.

Ensaio de PSA com sbp's rotulados diretos com SSIA

[000168] O conjugado Ab1-AK11 foi fornecido em PBS, pH 7,4 em 10µg/ml. O conjugado Ab2-HRP foi fornecido em PBS, pH 7,4 em 0,25µg/ml. Em um primeiro vaso de reação 25µl de conjugado Ab1-AK11, 600µM de ácido ascórbico em água deionizada, e 25µl de conjugado de Ab2-HRP são adicionados a 25µl de amostra e incubado durante 15 minutos. Para comparação sem SSIA, em um segundo vaso de reação, 25µl de conjugado de Ab1-AK11, 25µl de água, 25µl de conjugado Ab2-HRP foram adicionados a 25µl de amostra e incubados durante 15 minutos.

[000169] Em seguida a incubação, a reação quimioluminescente é iniciada em cada vaso de reação por injeção de 100µl de solução ativadora A. A corrente com injeção da solução ativadora no vaso de reação, o sinal quimioluminescente foi detectado por um luminômetro incorporando um tubo fotomultiplicador de fotocontagem (PMT). A coleção de sinal continuou durante o curso de 3,85 segundos e os dados de sinal quimioluminescente armazenados em um computador.

[000170] Cada amostra foi analisada de acordo com o método de ensaio acima em triplicata. Os dados de RLU coletados para cada amostra ensaiada durante o intervalo de tempo de 495 milissegundos começando 125 milissegundos do início da introdução de solução ativadora no vaso de reação foram somados para cada execução individual, calculado a média nos triplicados para cada amostra e apresentados na Tabela 13. Uma relação de sinal para ruído (S/S0) foi calculada em cada valor de concentração. Os dados na Tabela 13 podem ser utilizados para gerar uma curva de calibração para análise das amostras de concentração de PSA desconhecida.

Tabela 13.

PSA, ng/mL	Sem SSIA		Com SSIA	
	RLU	S/S0	RLU	S/S0
0,0	14388	1,0	180	1,0
0,4	9583	0,7	324	1,8
1,4	12980	0,9	755	4,2
7,0	13253	0,9	3032	16,8
51,0	28872	2,0	16373	91,0
101,6	36737	2,6	23119	128,4

[000171] O seguinte exemplo demonstrou imunensaio de acordo com a presente descrição de um analito utilizando anticorpos rotulados direto na ausência de fase sólida, tanto na presença quanto na ausência de SSIA. A partir dos resultados mostrados na Tabela 13, o ensaio de anticorpo diretamente rotulado sem SSIA não é (analito) responsivo à dose através da faixa total de concentrações de PSA ensaiadas. Em contraste, o imunensaio diretamente rotulado incorporando SSIA de acordo com a presente descrição é funcional, fornecendo resposta de dose de zero (controle) até todos os 5 valores de calibrador de PSA. Conseqüentemente, o imunensaio diretamente rotulado incorporando SSIA pode ser de modo bem sucedido utilizado para determinar as concentrações de analito desconhecidas em outras

amostras. Além disso, a adição de um SSIA melhora a relação de sinal para ruído (S/S0) sobre a faixa de calibração (PSA, ng/mL de 0 a 101,6).

Exemplo 3: ensaio de conjugados AB1~AK1, AB2~HRP para PSA

[000172] Os ensaios direcionados para PSA, utilizando sbp rotulado por quimioluminescente diretamente rotulado e sbp rotulado por ativador foram conduzidos na solução como descrito abaixo. Este experimento adicionalmente explorou o resultado de empregar reagentes conjugados com graus variados de purificação.

[000173] Anti-PSA de camundongo (MxPSA) (111 µL, 9 mg/mL) e éster de NHS de AK1 (106 µL, 1 mg/mL de matéria-prima de DMF) foram reagidos em borato a 0,1 M tampão de pH 8,25 (784 µL). A mistura foi misturada em temperatura ambiente durante 90 minutos. 100 µL da mistura de reação foram removidos, e 2,6 µL de uma solução de lisina (2 mg/mL) foram adicionados e misturados durante 30 minutos. Esta mistura de reação foi diluída em tampão de PBS para uso no ensaio de "conjugado não purificado". O conjugado preparado da mesma maneira foi purificado com uma coluna de dessalinização, como conhecido na técnica, para uso no ensaio de "conjugado purificado".

[000174] 30 µL de uma solução de conjugado de MxPSA-AK1 (67 ng), 24 µL de calibrador (0-129 ng/mL de PSA), 30 µL de conjugado de MxPSA-HRP (7,8 ng), e 36 µL de soro foram pipetados nas cavidades de uma placa de microtítulo branca. A placa foi incubada durante 10 minutos a 37°C. 5 µL de uma solução de ácido ascórbico (5,5 mM) foram adicionados. A placa foi colocada em um luminômetro de placa de injeção. 100 µL de solução ativadora A foram adicionados pelo luminômetro e o sinal quimioluminescente foi lido durante 5 segundos a partir da adição da solução ativadora.

[000175] A intensidade de sinal quimioluminescente (unidades luminescentes relativas, RLU) para as reações de conjugados de

MxPSA-AK1 "não purificados" e "purificados" como uma função da concentração de PSA na mistura de reação é fornecida na seguinte tabela.

Tabela 14

[PSA] (ng/mL)	Intensidade (RLU)	Intensidade (RLU)
	purificado	Não purificado
0	1,6	1,7
0,5	4,1	4
2	10,2	9,6
10,8	35,5	43,5
77,2	328	319
129	485	555

[000176] Os dados fornecidos na Tabela 14, quando transformados como um plote de log-log, mostraram que a intensidade de log de sinal quimioluminescente contra a concentração de log de PSA foi monotônico e aproximadamente linear na faixa [PSA] 0,5 ng/mL a 129 ng/mL, independente do nível de purificação do reagente de conjugado de MxPSA- AK1.

Exemplo 4: Imunoensaio Competitivo

[000177] Nesse aspecto são fornecidos imunoensaios homogêneos de um analito utilizando um anticorpo de captura rotulado por quimioluminescente em combinação com analito rotulado em uma reação de imunoensaio competitiva. O analito cíclico-AMP ("cAMP") de exemplo é conjugado com HRP para fornecer um reagente de cAMP-HRP, que compete para cAMP analito no anticorpo de captura ("Ab de captura") que é conjugado com AK5 para formar um complexo de anticorpo- AK5 de captura. Desse modo, sob formação do complexo de anticorpo- AK5-cAMP-HRP de captura e adição de solução ativadora como descrito aqui, quimioluminescência (isto é, "Luz") pode ser observada na medida em que o complexo de anticorpo- AK5-

cAMP-HRP de captura é formado. Analito (cAMP) que não é conjugado com HRP compete para o complexo de anticorpo- AK1 de captura, e sob adição de solução ativadora o complexo de anticorpo-AK5-cAMP de captura resultante fornece nenhuma quimioluminescência (isto é, "Nenhuma Luz"). Conseqüentemente, cAMP de analito compete para complexo de anticorpo-AK5 de captura e desse modo suprime o sinal devido ao complexo de anticorpo- AK1-cAMP-HRP de captura.

[000178] Anti cAMP de coelho (IMMUNOTECH, Marseille) 0,1 mg (20,3 uL de 4,93 mg/mL de matéria-prima) foi adicionado a 162 uL de borato de sódio a 0,1 M tampão de pH 8,25 em tubo de centrifuga de 1,7 mL. 17,6 ug de AK5 (17,6 ul de 1 mg/mL de matéria-prima de DMF) foi adicionado. Após mistura de vórtice rápida o tubo foi colocado em um agitador giratório durante 1 hora em temperatura ambiente. A reação foi extinta adicionando-se 1,2 uL de L-lisina de 3 mg/mL de matéria-prima. A mistura de reação foi diluída (1:1) em 0,4% de BSA e PBS e armazenada a 4C. cAMP-HRP foi preparado de acordo com a literatura. Veja, por exemplo, J Immunological Methods, 1992, 155 31-40. cAMP foi adquirido de Sigma, St. Louis, MO. Uma matéria-prima a 30 nM de cAMP foi preparada em PBS e também diluída em PBS para fazer os calibradores de amostra para o ensaio. Veja a Tabela 15.

[000179] O protocolo de imunoensaio competitivo foi como segue. Anti cAMP de coelho monoclonal rotulado por AK5 (0,275 ug/mL) (3uL), cAMP rotulado por HRP (0,09375ug/mL) (3ul) e calibradores de cAMP (4ul) foram adicionados em uma placa de baixo volume de poliestireno branco 384. As soluções de conjugado foram 0,2% em BSA. Após incubação de 30 minutos em temperatura ambiente, 1ul de 2-aminofenol (0,6875 mM) foi adicionado seguido por uma solução ativadora (10ul). A solução ativadora conteve Tris a 25 mM pH 8, ácido

p-hidroxicinâmico a 8 mM, EDTA a 1 mM, 0,2% de Tween-20 e ureaperóxido a 1 mM. A intensidade de luz foi medida (Spectromax) durante um segundo imediatamente sob injeção de ativador. Os reagentes não foram expostos à luz durante incubação e não foram agitados.

[000180] Como mostrado na Tabela 15 seguinte, os calibradores foram utilizados na faixa de 0,137 nM a 10000 nM. Os dados são fornecidos na Tabela 15, para que o IC₅₀ para cAMP fosse calculado ser 2,6 nM. Os dados demonstram que a supressão completa do sinal quimioluminescente pode ser obtida com os níveis de cAMP de analito em excesso de 100 nM.

Tabela 15. Imunoensaio de Competição para cAMP

nM	Média	Supressão de Sinal
0	91646	0%
0,137	89089	3%
0,412	83377	9%
1,23	66207	28%
3,7	31156	66%
11,1	4576	95%
33,3	943	99%
100	315	100%
1000	173	100%
10000	167	100%

Exemplo 5: Preparação de sbp rotulado por quimioluminescente incluindo rótulo quimioluminescente, BSA biotinilado, neutravidina e anticorpo

[000181] Deste exemplo descreve "tetrâmero" arcabouços ou complexos formados por automontagem através de interação não covalente de biotina e estreptavidina. O exemplo também demonstra imunoensaios para um analito utilizando um arcabouço de tetrâmero.

A. Rotulação de BSA com composto quimioluminescente e biotina:

[000182] Albumina de soro bovino (BSA) rotulado com sulfo-NHS-LC-biotina (Thermo Scientific, Rockford IL) e éster de AK1-NHS (Lumigen, Southfield MI) foram misturados em uma relação molar de 7 moles de AK1 por mole de BSA; 3 moles de biotina por mole de BSA), e a mistura foi purificada em uma coluna de dessalinização PD-10 como descrito no Exemplo 17.

B. Preparação de Conjugado de Neutravidina-IgG

[000183] O anticorpo monoclonal anti-PSA tiolado foi preparado como descrito no Exemplo 2.

[000184] Um excesso molar de 3 vezes de neutravidina ativada por maleimida (Thermo Scientific) foi adicionado à solução anti-PSA monoclonal tiolada (5mg) e incubado em um girador em temperatura ambiente durante uma hora no escuro. Os grupos tiol e maleimida não reagidos foram bloqueados por adições sequenciais de L-cisteína e iodoacetamida (15 minutos cada etapa) à mistura de reação conjugada. O conjugado foi purificado em uma coluna Superdex® 200 (GE Healthcare, Piscataway NJ), e equilibrado em PBS, pH 7,4, para remover neutravidina não reagida. As frações de HPLC contendo o conjugado foram agrupadas e utilizadas na preparação dos complexos de arcabouço de tetrâmero.

C. Preparação de complexos de arcabouço contendo IgG conjugado por neutravidina e BSA rotulado

[000185] Um excesso molar de 3 vezes de BSA rotulado, como descrito acima, foi adicionado ao IgG conjugado por neutravidina e os complexos foram permitidos se formar durante 30 minutos em temperatura ambiente. O produto final foi purificado por HPLC como descrito acima, e os produtos foram armazenados a 4°C até outro uso.

D. Imunoensaio de PSA com arcabouço de tetrâmero

[000186] O imunoensaio para PSA foi realizado substancialmente

como descrito no Exemplo 2. Resumidamente, volumes iguais (25uL cada) do arcabouço de tetrâmero, conjugado de HRP, ácido ascórbico a 600 µM e amostra de PSA foram combinados em um vaso de reação e incubados a 37°C durante 15 minutos. Em seguida a incubação, uma reação quimioluminescente foi iniciada por injeção de 100 µL de solução ativadora A no vaso de reação. Concorrente com a injeção, o sinal quimioluminescente foi detectado por um luminômetro incorporando um tubo fotomultiplicador (PMT) durante o curso de 275 milissegundos e os dados armazenados em um computador.

[000187] As amostras de concentração de PSA conhecida foram preparadas como descrito previamente para alcançar as concentrações de PSA fornecidas na Tabela 16. As amostras foram em seguida analisadas como descrito acima, e os dados foram utilizados para gerar uma curva de calibração para análise de amostras de concentração de PSA desconhecida.

TABELA 16.

	Arcabouço de Anti-PSA-neutravidina-Biotina-BSA-AK1				
Concentrações de Imunorreação					
Arcabouço (µg/mL de IgG)	0,05	0,2	0,5	2	5
anti-PSA~HRP (µg/mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ácido ascórbico (µM)	600	600	600	600	600
[PSA] (ng/mL)	RLU (Média durante 275 ms)				
0,0	40	55	72	81	139
0,4	93	180	357	616	777
1,4	281	747	1.456	2.245	2.469
7,0	3.085	8.983	14.819	16.717	13.931
51,0	43.316	153.325	302.112	467.243	279.741
101,6	59.096	210.419	445.267	933.172	792.293
	Relação de Sinal/Ruído				

0,0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0,4	2,33	3,29	4,96	7,57	5,61
1,4	7,03	13,66	20,22	27,61	17,81
7,0	77,13	164,32	205,81	205,54	100,46
51,0	1082,90	2804,73	4196,00	5744,79	2017,37
101,6	1477,40	3849,12	6184,26	11473,43	5713,65

Exemplo 6. Preparação de Auxiliar Rotulado por Quimioluminescente, Anticorpo Biotinilado e Polímero de Estreptavidina-IgG Automontado

[000188] Neste exemplo, estreptavidina rotulada por AK1 foi misturada com um anticorpo biotinilado, desse modo formando polímeros por automontagem. Estes polímeros de estreptavidina/biotina-IgG automontados podem ser utilizados como arcabouços para imunoensaio de um analito.

A. Preparação de Estreptavidina rotulada por AK1

[000189] AK1 (Lumigen, Southfield, MI) foi dissolvido em DMSO anidro em uma concentração de 30 mg/mL. Seis (6) equivalentes molares foram adicionados a uma solução de 10,1 mg/mL de estreptavidina (Streptavidin-plus®, Prozyme, San Leandro, CA) preparada em água contendo NaCl a 50 mM. A reação foi permitida prosseguir no escuro durante 60 minutos e subsequentemente purificada por cromatografia de exclusão de tamanho utilizando uma coluna Sephadex® G-25 (GE Healthcare, Piscataway NJ) equilibrada com PBS, pH 7,2. A relação molar de AK1:proteína foi determinada por espectroscopia UV utilizando as seguintes equações:

$$[AK11] = A_{384}/11.380\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$$

$$[\text{estreptavidina}] = (A_{280} - (A_{384}/(A_{384}/A_{280} \text{ AK1}))) / 176.000\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$$

[000190] A segunda equação foi utilizada para corrigir quanto à absorção de AK1 em 280 nm. Sob estas condições, uma relação molar de AK1:estreptavidina de 4,3 AK1 por estreptavidina foi obtida com uma produção de 94%.

Preparação de anticorpo monoclonal anti-cTnI rotulado por AK11

[000191] O anticorpo rotulado por AK-1 foi preparado como descrito no exemplo 2, exceto um excesso molar de 15 vezes de AK-1 para IgG foi utilizado para preparar o IgG diretamente rotulado.

B. Preparação de anticorpos monoclonais anti-cTnI biotinilados

[000192] Um excesso molar de 10 vezes de NHS-LC-biotina (Thermo Scientific, Rockford IL) foi adicionado ao anticorpo monoclonal anti-cTnI, e a mistura foi incubada em temperatura ambiente durante 2 horas. O anticorpo biotinilado foi purificado por diálise em PBS, pH 7,2. A relação molar de biotina:anticorpo foi 4,9, como determinado utilizando o kit de quantificação de biotina comercial (Thermo Scientific)

C. Preparação de Arcabouço de Polímero Automontado

[000193] O polímero automontado foi preparado adicionando-se 2 equivalentes molares de anticorpo cTnI biotinilado a 1 equivalente molar de estreptavidina rotulada por AK11. A mistura foi incubada em temperatura ambiente no escuro durante 90 minutos para permitir que os complexos se formem. A mistura de reação foi purificada em uma coluna Superdex® 200 como descrito no Exemplo 3. As frações de HPLC correspondendo ao conjugado de peso molecular elevado (800kDa - >1,5MDa) foram agrupadas e armazenadas a 4 graus C até o uso.

D. Imunoensaio para cTnI

[000194] O imunoensaio para cTnI foi realizado como segue. 25 µL de cada do arcabouço de polímero automontado, ou anticorpo diretamente rotulado como o controle, conjugado de HRP, ácido ascórbico a 600 µM e amostra foram misturados em um vaso de reação, e incubados durante 15 minutos. Em seguida a incubação, a reação de quimioluminescência foi iniciada por injeção de 100 µL de solução ativadora A no vaso de reação. Concorrente com a injeção da

solução ativadora no vaso de reação, o sinal quimioluminescente foi detectado por um luminômetro incorporando um tubo fotomultiplicador de fotocontagem (PMT) durante o curso de 275 milissegundos, e os dados são armazenados em um computador.

[000195] As amostras de cTnI de concentração conhecida foram preparados adicionando-se quantidades conhecidas de cTnI nativo a soro humano normal para alcançar as concentrações de cTnI indicadas na Tabela 17. Cada amostra foi analisada triplicata de acordo com o método descrito acima (e no Exemplo 4 para imunensaio de PSA). Os dados de RLU coletados para cada amostra ensaiada durante um determinado intervalo de tempo foram somados para cada execução individual e calculado a média nos triplicados para cada amostra. Uma relação de sinal para ruído foi determinada para amostras em cada concentração conhecida.

TABELA 17

[cTnI], ng/mL	IgG rotulado por acridan (Controle)	Arcabouço de Automontagem de SA-IgG	
			Média RLU
190			3.757.770
41			1.326.964
9,2			380.904
2,3			101.228
0,82			41.548
0,22			17.520
0,1			12.871
0			9.966
			92.017.724
			20.703.152
			3.414.677
			628.395
			210.780
			67.552
			32.802
			16.183
			% de Controle
			2449%
			1560%
			896%
			621%
			507%
			386%
			255%
			162%
			Relação de Sinal/Ruído
			% de Controle
190			377,07
41			133,15
9,2			38,22
2,3			10,16
			5685,99
			1279,30
			211,00
			38,83
			1508%
			961%
			552%
			382%

0,82	4,17	13,02	312%
0,22	1,76	4,17	237%
0,1	1,29	2,03	157%
0	1,00	1,00	100%

[000196] Os dados na Tabela 17 ilustraram a resposta de dose bem sucedida para imunoensaio de concentrações de Tnl de analito de 0 a 190 ng/ml para ambos os formatos de ensaio. Os resultados do Exemplo 6 também mostraram aumento na intensidade de sinal (mostrado por RLU médio) e melhora em sinal para ruído (S/S0) para o ensaio utilizando polímeros de estreptavidina/biotina-IgG (anticorpo) automontados quando comparados com anticorpo diretamente rotulado com acridan.

Exemplo 7: Preparação de sbp rotulado por quimioluminescente incluindo rótulo quimioluminescente, KLH, e Anticorpo Acoplado à Estreptavidina-Biotina

[000197] Este exemplo demonstra o uso de hemocianina lapa em buraco de fechadura (KLH) na preparação de um grande arcabouço de polímero. O KLH ativado por maleimida é conjugado com o anticorpo e rotulado com AK1 para formar o arcabouço. Este exemplo também demonstra o uso de tais arcabouços em imunoensaios para um analito.

A. Tioação de anticorpos monoclonais de cTnl

[000198] Anti-cTnl monoclonal foi tiolado adicionando-se lactone de homocisteína de N-acetila a 50 mM (AHTL) (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) ao anticorpo em pH 9,0, e permitindo a mistura reagir durante 1 hora em temperatura ambiente. O anticorpo tiolado foi purificado utilizando uma coluna de dessalinização PD-10, como descrito no exemplo 2.

B. Preparação e rotulação de arcabouço de KLH

[000199] 3,4 mg de anti-cTnl tiolado foram adicionados a 10 mg de KLH ativado por maleimida (produto N° 77605, ThermoScientific) e a

solução resultante foi incubada em temperatura ambiente durante 2 horas. Para rotular o conjugado de anticorpo-KLH, 0,9 mg de éster de AK1-NHS, dissolvido em 0,7mL de DMSO, foi adicionado a solução e permitido reagir durante 15 minutos. O conjugado foi em seguida purificado por permuta de tampão (fosfato a 20mM, EDTA a 1mM) utilizando um concentrador centrífugo de 30kDa MWCO Ultracell (Millipore, Billerica MA).

C. Imunoensaio com arcabouço de KLH de proteína grande

[000200] Um imunoensaio para cTnI utilizando o arcabouço de KLH de proteína grande foi realizado como descrito no Exemplo 6. As amostras de concentração de cTnI conhecida foram preparadas como descrito no Exemplo 6. Brevemente, volumes iguais (25 µL) do arcabouço de KLH em 10ug/mL (normalizado para concentração de IgG), 1ug/mL, conjugado de HRP, ácido ascórbico a 600 mM em água e amostra foram misturados juntos em um vaso de reação. A mistura foi incubada com 100 µL de solução ativadora A (isto é uma solução ativadora) para iniciar a reação quimioluminescente. Após iniciação da reação quimioluminescente, as amostras foram lidas em um luminômetro de microplaca SpectraMax® L no modo cinético de leitura rápida, e o sinal quimioluminescente foi registrado durante um período de tempo de cerca de 0,12 a 0,21 segundos. Os resultados do imunoensaio são mostrados na Tabela 18.

TABELA 18.

[cTnI], ng/mL	RLU Médio
0	20.675
0,1	61.589
25,0	32.757.125

Exemplo 8: Preparação de SBP rotulado por quimioluminescente incluindo rótulo quimioluminescente, micropartícula de estreptavidina e anticorpo biotinilado

[000201] Este exemplo descreve a preparação de micropartículas de

proteína de estreptavidina rotulada por AK1 por dessolvatação. Após acoplamento com um anticorpo biotinilado, a partícula de estreptavidina pode ser utilizada como arcabouço para imunoenaios.

A. Preparação de micropartículas proteína

[000202] A estreptavidina rotulada por AK1 foi preparada como descrito no Exemplo 6. 9,8 mg (2 mL) da estreptavidina rotulada por AK1 foram adicionados a um frasco de reação de vidro de 4 mL e agitado em uma taxa constante de 350 rpm utilizando uma barra de agitação de Teflon. 2,8mL de etanol absoluto (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) foram em seguida adicionados em gotas em uma taxa de 2 mL/minuto até que a solução ficasse turva. 12 µL de uma solução de glutaraldeído a 5% (Sigma-Aldrich; diluída 1:10 em água destilada) foram em seguida adicionados à reação e misturados durante um adicional de 60 minutos para reticular as subunidades de estreptavidina das partículas formadas por dessolvatação. A quantidade molar de glutaraldeído foi igual ao número de resíduos de lisina presente em 9,8mg de estreptavidina. 12µL de uma solução de etanolamina a 0,832M aquosa (Sigma-Aldrich) foram em seguida adicionados para extinguir a reação, seguido pela adição de 2,8µL de uma solução Tween®-20 a 20% aquosa para estabilizar as partículas.

[000203] As partículas foram colocadas em um cassete de diálise Slide-A-Lyzer (Thermo Scientific, Rockford, IL) e dialisadas contra PBS, pH 7,4 contendo 0,01% de Tween-20 a 4°C. O tampão de diálise (1L) foi permutado duas vezes durante um período de 24 horas para remover os subprodutos da reação. A concentração de estreptavidina da solução de partícula foi em seguida medida utilizando um kit de ensaio de proteína de ácido bicinonínico comercial (BCA) (produto N° 23227, ThermoScientific). Estreptavidina SA-21 (E280=3,2cm-1mg/mL-1) foi utilizada para preparar padrões em concentrações conhecidas e a concentração de proteína das partículas foi calculada da curva de

calibração ou padrão.

[000204] As partículas purificadas foram analisadas por espectroscopia de foto correlação utilizando um Analitor de Tamanho de Partícula Submicrom e Potencial de Delsa™Nano Zeta (Beckman Coulter) e foram constatadas ter um diâmetro médio de aproximadamente 4 microns. Variando-se as condições descritas aqui (volume de solvente utilizado para dessolvatar as partículas, pH da reação, etc) o tamanho de partícula desejado (~200 nm a 4 µm) pode ser obtido.

B. Ensaio para cTnI utilizando partícula de estreptavidina

[000205] As partículas de estreptavidina rotuladas por AK1 foram revestidas com anticorpo anti-cTnI biotinilado em PBS em pH 7,4 e a relação de 0,23 mg de IgG por mg das partículas. A mistura foi incubada em temperatura ambiente durante 30 minutos com agitação suave para permitir complexar o IgG biotinilado com as partículas de estreptavidina. As partículas foram em seguida centrifugadas em 10.000 x g durante 5 minutos, e o sobrenadante contendo qualquer IgG não ligado, foi removido. O pélete de partícula foi ressuspenso em PBS, em pH 7,4 contendo 0,1% de Tween-20 para uma concentração final de 100 µg/mL de estreptavidina.

[000206] Uma mistura contendo 50 µg/mL de partículas de estreptavidina revestidas com anticorpo anti-cTnI em uma concentração de 0,15 µg/mL, conjugado de peroxidase de rábano silvestre, ácido ascórbico a 375 µM e 1mg/mL de IgG (BCI item 270904) foi preparado no diluente de ensaio. O ensaio foi realizado adicionando-se 70 µL da mistura de conjugado/partícula de HRP e 30 µL de cada amostra a um vaso de reação. As amostras de concentrações de cTnI conhecidas foram preparadas reforçando-se as quantidades conhecidas de cTnI nativo (Scipac, Sittingbourne UK) em soro humano normal, e as concentrações de amostra foram

designadas de valores de dose gerados do ensaio AccuTnl (Beckman Coulter). Em seguida a uma incubação de 15 minutos em temperatura ambiente, as amostras foram lidas em um luminômetro de microplaca SpectraMax® L (MDS Analytical Technologies) no modo de leitura cinética rápida. Para iniciar a reação quimioluminescente, um volume igual de solução ativadora A foi injetado em uma taxa de 350 µL/sec ao mesmo tempo em que monitorando o sinal quimioluminescente. O *software* SoftMax Pro foi utilizado para analisar os dados. Os valores são reportados como a soma de 20 pontos de dados (10 ms de tempo de integração), começando 30 ms após a iniciação de quimioluminescência, e são mostrados na Tabela 19.

TABELA 19.

[cTnl], ng/mL	RLU Médio
22,900	10.055.867
5,100	2.296.862
1,290	299.171
0,322	180.060
0,031	49.456
0,000	37.747

Exemplo 9: Variação de Concentrações de Componente de Ensaio para Ensaio de PSA com sbp Rotulado por Quimioluminescente incluindo Arcabouço de Dextrano e SSIA

[000207] Os seguintes exemplos demonstram imunoensaio de um analito utilizando um sbp rotulado por quimioluminescente incluindo um arcabouço de dextrano solúvel diretamente rotulado com composto e anticorpo quimioluminescente.

[000208] Neste exemplo, um membro de um par de ligações específico de anticorpos monoclonais para PSA é conjugado para uma molécula de dextrano acoplada com AK1, como descrito no Exemplo 10 abaixo, exceto que o anticorpo é tiolado e covalentemente ligado a dextrano ativada por maleimida e rotulada por AK11. O conjugado de

anti-PSA –dextrano foi fornecido em uma solução aquosa a 10µg/ml, 2,5 µg/ml ou 0,5 µg/ml como indicado nas tabelas abaixo. Um segundo anticorpo PSA monoclonal foi conjugado para HRP, como descrito acima e fornecido em uma solução aquosa em 0,5µg/ml, 0,1 µg/ml ou 0,03 µg/ml como indicado nas tabelas abaixo.

[000209] Os ensaios foram realizados colocando-se 25 µl de amostra em cada dos dois vasos de reação. À amostra no primeiro vaso de reação, 25µl de solução de Ab1, 25µl de água, 25µl de solução de Ab2 foi adicionado e incubado durante 15 minutos. Em um segundo vaso de reação 25µl de solução Ab1, Ácido ascórbico (Sigma, St. Louis, MO) em água deionizada nas concentrações de 200 ou 500µM (como indicado na tabela abaixo), e 25µl de solução Ab2 foram adicionados a 25µl da amostra e incubados durante 15 minutos. Em seguida a incubação, a reação quimioluminescente em cada vaso de reação foi iniciada por injeção de 100µl de solução ativadora A. Concorrente com a injeção da solução ativadora no vaso de reação, o sinal quimioluminescente é detectado por um luminômetro incorporando um tubo fotomultiplicador de fotocontagem (PMT) durante o curso de 3,85 segundos e os dados armazenados em um computador.

[000210] Cada amostra foi analisada de acordo com o método de ensaio acima em triplicata. Os dados de RLU coletados para cada amostra ensaiada durante o intervalo de tempo de 495 milissegundos começando 82,5 milissegundos do início da introdução da solução ativadora no vaso de reação foram somados para execução individual, calculada a média sobre triplicatos para cada amostra e apresentado na Tabela 20. Uma relação de sinal para ruído (S/S0) foi calculada em cada valor de concentração. Os dados na Tabela 20 podem ser utilizados para gerar uma curva de calibração para análise de amostras de arcabouço.

[000211] As amostras de concentração conhecida foram preparadas

como descrito previamente. Cada amostra foi analisada de acordo com o método acima em triplicata.

Tabela 20

PSA, ng/mL	Sem SSIA		w/ SSIA	
	RLU	S/S0	RLU	S/S0
0,0	222449	1,0	1756	1,0
0,4	186876	0,8	4393	2,5
1,4	150945	0,7	13337	7,6
7,0	243129	1,1	57119	32,5
51,0	946997	4,3	362044	206,2
101,6	1491153	6,7	604024	344,0

[000212] Estes próximos ensaios de demonstração utilizam reagentes similares ao exemplo anterior. Um membro de um par de ligações específico para PSA é conjugado para uma molécula de dextrano acoplada com AK1, e fornecida em uma solução aquosa em 10µg/ml, 2,5 µg/ml ou 0,5 µg/ml como indicado nas tabelas abaixo. Um segundo anticorpo PSA monoclonal é conjugado para HRP, como descrito acima e fornecido em uma solução aquosa em 0,5µg/ml, 0,1 µg/ml ou 0,03 µg/ml como indicado nas tabelas abaixo.

[000213] Cada amostra foi analisada de acordo com o seguinte método em triplicata.

[000214] O ensaio foi realizado colocando-se 25µl de amostra em um vaso de reação, em seguida adicionando-se 25µl de solução de Ab1, ácido ascórbico em água nas concentrações de 200 ou 500µM, como indicado na tabela abaixo, e 25µl de solução Ab2, desse modo criando uma mistura de reação. A mistura foi somente por liberação de cada reagente, seguido por 15 minutos de incubação. Em seguida a incubação, a reação quimioluminescente é iniciada em cada vaso de reação por injeção de 100µl de solução ativadora A e a luz gerada pela reação foi detectada por um luminômetro de fotocontagem durante 3,85 segundos e os dados de RLU armazenados em um computador.

[000215] Os dados de RLU coletados para cada amostra ensaiada durante o intervalo de tempo de 495 milissegundos começando 125 milissegundos do início da introdução de solução ativadora no vaso de reação foram somados para cada execução individual, calculada a média sobre as três replicações para cada amostra e apresentado nas Tabelas 21-23. Uma relação de sinal para ruído (S/S0) e % CV foi calculada em cada valor de concentração. Os dados nas tabelas podem ser utilizados para gerar uma curva de calibração para análise das amostras para determinação de concentração de PSA utilizando os materiais e guia deste exemplo.

[000216] Os resultados do Exemplo 9 demonstraram que imunoenaios bem sucedidos são sbp rotulado por quimioluminescente variado, sbp rotulado por ativador, e concentrações de SSIA e diferentes relações daqueles reagentes. Os métodos do Exemplo 9 são adequados para uso na determinação de concentração de analito em amostras desconhecidas, incluindo a geração de curvas de calibração para determinação de concentração de PSA de acordo com os métodos padrão.

Tabela 21.

	Concentração de solução de cada reagente.					
Dextrano-Ab1-AK1 ug/mL	10	10	10	10	10	10
Conjugado de AB2- HRP ug/mL	0,5	0,5	0,1	0,1	0,03	0,03
Ácido ascórbico uM	200	500	200	500	200	500
	Quantidade no Vaso de reação					
Ab de Captura (ng)	250	250	250	250	250	250
HRP-conj (ng)	12,5	12,5	2,5	2,5	0,75	0,75
Concentração de Ácido ascórbico uM	50	125	50	125	50	125
Ácido ascórbico nMoles	5	12,5	5	12,5	5	12,5

PSA (ng/mL)	Soma de RLU					
0,0	7.713	2.224	1.633	607	659	305
0,4	10.169	3.769	2.453	1.173	1.020	543
1,4	19.053	9.363	5.424	3.213	1.913	1.164
7,0	63.211	36.408	19.852	12.859	6.972	4.311
51,0	363.729	224.620	122.425	74.771	40.588	24.837
101,6	683.660	403.413	182.711	115.324	56.025	37.695
PSA (ng/mL)	S/S0					
0,0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0,4	1,32	1,69	1,50	1,93	1,55	1,78
1,4	2,47	4,21	3,32	5,30	2,90	3,81
7,0	8,19	16,37	12,15	21,20	10,59	14,12
51,0	47,16	101,00	74,95	123,25	61,62	81,34
101,6	88,63	181,39	111,86	190,09	85,06	123,45

Tabela 22

	Concentração de Solução de cada reagente					
Dextrano-Ab1-AK1 ug/mL	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Conjugado de AB2-HRP ug/mL	0,5	0,5	0,1	0,1	0,03	0,03
Ácido ascórbico uM	200	500	200	500	200	500
	Quantidade em Vaso de reação					
Ab de Captura (ng)	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
HRP-conj (ng)	12,5	12,5	2,5	2,5	0,75	0,75
Concentração de Ácido ascórbico uM	50	125	50	125	50	125
Ácido ascórbico nMoles	5	12,5	5	12,5	5	12,5
PSA (ng/mL)	Soma de RLU					
0,0	1.860	623	463	211	224	111
0,4	3.973	2.132	1.261	800	461	332

1,4	11.417	6.659	3.780	2.359	1.239	852
7,0	49.103	31.767	17.005	10.921	5.420	3.903
51,0	386.67 1	229.809	105.745	72.211	36.383	22.780
101,6	695.365	434.443	164.713	114.544	50.955	34.411
PSA (ng/mL)	S/S0					
0,0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0,4	2,14	3,42	2,73	3,80	2,06	3,00
1,4	6,14	10,69	8,17	11,20	5,53	7,70
7,0	26,40	51,02	36,76	51,84	24,20	35,27
51,0	207,89	369,07	228,56	342,77	162,42	205,84
101,6	373,85	697,71	356,01	543,72	227,48	310,94

Tabela 23.

Concentração da Solução	Concentração de Solução de cada reagente					
Dextrano-Ab1-AK1 ug/mL	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Conjugado de AB2-HRP ug/mL	0,5	0,5	0,1	0,1	0,03	0,03
Ácido ascórbico uM	200	500	200	500	200	500
Quantidade em RV	Quantidade em Vaso de reação					
Ab de Captura (ng)	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
HRP-conj (ng)	12,5	12,5	2,5	2,5	0,75	0,75
Concentração de Ácido ascórbico uM	50	125	50	125	50	125
Ácido ascórbico nMoles	5	12,5	5	12,5	5	12,5
PSA (ng/mL)	Soma de RLU					
0,0	425	156	127	77	76	57
0,4	2.455	1.403	820	543	305	223
1,4	8.292	5.135	2.740	2.004	1.091	727
7,0	41.265	24.752	14.593	9.851	4.912	3.396
51,0	411.059	277.775	115.507	73.619	34.512	21.580
101,6	766.601	564.197	170.416	113.653	47.253	30.481

PSA (ng/mL)	% de CV					
0,0	6,8%	5,1%	1,8%	10,8%	0,0%	17,6%
0,4	16,2%	1,4%	4,8%	3,8%	8,0%	11,0%
1,4	2,5%	2,2%	5,6%	0,3%	2,8%	3,9%
7,0	4,8%	2,0%	4,0%	0,1%	4,3%	3,7%
51,0	3,0%	2,8%	1,2%	8,0%	2,3%	4,2%
101,6	7,2%	3,3%	2,9%	2,9%	1,5%	3,0%
PSA (ng/mL)	S/S0					
0,0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0,4	5,77	8,99	6,47	7,02	4,02	3,88
1,4	19,50	32,91	21,63	25,91	14,35	12,67
7,0	97,02	158,67	115,21	127,38	64,63	59,23
51,0	966,44	1780,61	911,89	951,97	454,11	376,40
101,6	1802,35	3616,65	1345,39	1469,66	621,75	531,65

Exemplo 10: Preparação de sbp rotulado por quimioluminescente incluindo rótulo quimioluminescente, arcabouço de dextrano-Estreptavidina, e anticorpo acoplado à Biotina e Uso em ensaios para Tnl, CKMB ou Mioglobina com vários SSIA.

A. Rotulação de dextrano modificado por amino com composto quimioluminescente e amina e reticulador heterobifuncional reativo de sulfidrina:

[000217] 5,2 mg de NHS-(PEO)8-Maleimida (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) e 22,1mg de AK1, um cetenoacetato de acridan –éster de NHS, sal de amônio foram dissolvidos em DMSO para 30mg/mL, combinado, e adicionado a 35 mg de 70kDa de Poliaminodextrano (Helix Research, produto N° 1209; 70 moles NH₂/mole de dextrano), dissolvido em PBS, pH 7,2 em 14mg/mL, em um vaso de reação de polipropileno. A mistura de reação foi incubada durante 45 minutos em temperatura ambiente protegida da luz. Os grupos amino não reagidos no poliaminodextrano foram bloqueados incubando-se o conjugado com 10µL de MS(PEG)8 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) durante um adicional de 10 minutos em

temperatura ambiente no escuro. O dextrano ativado foi clarificado por microcentrifugação (14K x g, 1 min.) e purificado em uma coluna Sephadex G-25 (GE Healthcare, Piscataway, NJ), equilibrado em PBS, pH 7,2 contendo EDTA a 1mM, seguindo as instruções do fabricante.

B. Tioação de estreptavidina:

[000218] Um excesso molar de 50 vezes (5,63 mg) de 2-iminotiolano (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) foi adicionado a 45 mg (10mg/mL) de estreptavidina-plus® (Prozyme, Hayward, CA). PBS, pH 7,4 (1mL) foi adicionado a mistura para aumentar o pH da reação para 7,0. A mistura foi incubada em temperatura ambiente durante 45 minutos no escuro. A estreptavidina tiolada foi purificada em colunas Sephadex® G-25 (GE Healthcare, Piscataway, NJ), equilibrada em PBS, pH 7,2 contendo EDTA a 1mM, seguindo as instruções do fabricante.

C. Conjugação de estreptavidina tiolada para dextrano derivado de AK e ativado por maleimida.

[000219] Em seguida, o dextrano ativado (A) e estreptavidina tiolada (B) foram combinados e reagidos durante a noite em temperatura ambiente, protegidas da luz. Os grupos tiol e maleimida não reagidos foram subsequentemente bloqueados em um processo de duas etapas. Na primeira etapa, um excesso (0,025X de volume de reação) de 50mg/mL de L-cisteína-HCl (dissolvido em PBS, pH 7,4) foi adicionado ao conjugado e incubado 15 minutos. Na segunda etapa, um excesso (0,04X de volume de reação) de 50mg/mL de iodoacetamida (dissolvido em PBS, pH 7,4) foi adicionado a mistura de reação junto com Borato a 50mM, pH 8,5 (0,08X de volume de reação) e incubado durante um adicional de 15 minutos em temperatura ambiente protegido da luz.

D. Purificação de Conjugado de Estreptavidina~dextrano~AK1

[000220] O conjugado foi clarificado por microcentrifugação (14K x g,

2 min.) e purificado em uma coluna Superdex® 200 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) equilibrada em PBS, pH 7,4 em um Sistema de HPLC System Gold® (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA) com Bomba de Gradiente Binário 125 e Detector de Arranjo de Diodo 168 acoplado a um coletor de fração Gilson FC 203B. A taxa de fluxo programada foi 1mL/min.; volume de alça de injeção da amostra - 1mL; fracionamento- 1 mL/fração). As frações de conjugado foram cuidadosamente agrupadas para excluir uma pequena quantidade de estreptavidina não reagida que elui após o conjugado. A concentração de estreptavidina no conjugado agrupado foi determinada com o ensaio de proteína de BCA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), utilizando estreptavidina plus® em concentrações predeterminadas como padrões. A concentração de AK1 foi determinada espectrofotometricamente ($E_{384}=13,6 \text{ mg}^{-1}\text{mL}^{-1}$). A concentração de estreptavidina calculada e relação molar de AK:estreptavidina do conjunto de conjugado foi 1,47 mg/mL e 18:1, respectivamente.

E. Biotinilação de anticorpos monoclonais de xPSA

[000221] Os anticorpos de PSA biotinilados foram preparados adicionando-e um excesso molar de 6 vezes de NHS-(PEO)4-biotina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), dissolvido em DMSO a 2mg/mL, a 6mg de anticorpo MxPSA (7,6 mg/mL em PBS, pH 7,4). Após uma incubação de 60 min. em temperatura ambiente, o anticorpo biotinilado foi purificado em uma coluna Sephadex G-25 (GE Healthcare, Piscataway, NJ), equilibrada em PBS, pH 7,4, seguindo as instruções do fabricante.

F. Acoplamento de Anticorpo Biotinilado aos Conjugados de Estreptavidina~dextrano~AK

[000222] O acoplamento foi realizado incubando-se o conjugado de estreptavidina~dextrano~AK (1,47µg/mL) com anti-PSA monoclonal biotinilado (2µg/mL) em diluente (Tris a 100mM, pH 8,0, NaCl a

150mM, 0,2% Tween®-20, EDTA a 0,1mM, 1% de BSA) durante 30 minutos. Isto corresponde a uma relação molar de 2:1 de estreptavidina: anticorpo biotilado.

G. Ensaios para Tnl, CKMB ou Mioglobina com sbp rotulado por quimioluminescente de Arcabouço de Dextrano e SSIA

[000223] Este exemplo demonstra os métodos de ensaio para detectar um analito, tal como Troponina I, CKMB ou Mioglobina. Para cada ensaio, o par de ligações específico empregado é um par de anticorpos monoclonais, cada anticorpo específico para um sítio antigênico diferente no analito especificado. Para cada ensaio, um primeiro anticorpo foi biotilado e conjugado para um arcabouço de Dextran-AK1-estreptavidina ("arcabouço Ab"), preparado por métodos similares àqueles descritos acima no Exemplo 5, e fornecido em uma solução aquosa em 0,5µg/ml ou 2µg/ml. Um segundo anticorpo para cada ensaio foi conjugado com HRP como descrito acima, ("conjugado HRP") e fornecido em 0,25µg/ml ou 1µg/ml em solução aquosa (Tris a 100 mM, NaCl a 150mM pH 8,0, 0,2% de Tween20, EDTA a 0,1mM, 1% de BSA).

[000224] Cada ensaio foi realizado adicionando-se 25 µl de arcabouço Ab, 25µl de ácido ascórbico a 600µM em água, 25µl de amostra e 25µL de conjugado de HRP a um vaso de reação. A mistura de reação foi incubada durante 15 min a 37°C. O vaso de reação foi posicionado para detecção por luminômetro, em seguida 100 µL de solução ativadora A foi adicionado e a intensidade de luz registrada durante um período de tempo de vários segundos. Os dados coletados pelo luminômetro correspondendo a um tempo decorrido de 302,5 milissegundos aproximadamente centralizados sobre o sinal máximo foram somados, calculado a média em três execuções por amostra e apresentados na Tabela 24-26. Sinal para ruído foi calculado par cada amostra.

[000225] Os resultados deste exemplo demonstram a aplicação de ensaios do presente a outros analitos. Além disso, o exemplo de modo bem sucedido demonstra ensaios utilizando diferentes concentrações e relações de reagentes para sbp rotulado por quimioluminescente, sbp rotulado por ativador, e SSIA. Os métodos do Exemplo 7 são adequados para uso na determinação de concentração de analito em amostras desconhecidas, incluindo a geração de curvas de calibração para determinação de concentração de Tnl, CKMB ou Mioglobina de acordo com os métodos padrão.

Tabela 24. Tnl

Arcabouço Ab µg/mL		0,5		0,5		2		2	
HRP-conj µg/mL		0,25		1		0,25		1	
Ácido ascórbico µM		600		600		600		600	
Cal.	Tnl ng/ml								
		RLU	S/S0	RLU	S/S0	RLU	S/S0	RLU	S/S0
S0	0	53		71		95		171	
S1	0,17	72	1,4	112	1,6	152	1,6	329	1,9
S2	0,37	116	2,2	169	2,4	201	2,1	481	2,8
S3	1,37	236	4,4	345	4,9	547	5,8	1,029	6,0
S4	11,1	1743	32,7	3165	44,8	1203	12,7	8,697	51,0
S5	27,9	4863	91,2	8371	118,5	7813	82,5	22,883	134,1
S6	106	25494	478,0	47372	670,4	54992	580,9	125,264	734,0

Tabela 25. CKMB

Arcabouço Ab µg/mL		0,5		0,5		2		2	
HRP-conj µg/mL		0,25		1		0,25		1	
Ácido ascórbico µM		600		600		600		600	
Cal.	CKMB ng/ml								
		RLU	S/S0	RLU	S/S0	RLU	S/S0	RLU	S/S0

S0	0,6	72		120		113		264	
S1	3,2	92	1,3	143	1,2	160	1,4	404	1,5
S2	9,6	111	1,5	247	2,1	231	2,0	700	2,7
S3	29,2	179	2,5	451	3,8	448	4,0	1499	5,7
S4	109,4	523	7,3	1635	13,6	1593	14,1		
S5	315,8	1953	27,1	6641	55,3	5977	52,7	21517	81,5

Tabela 26. Mioglobina

Arcabouço Ab µg/mL		0,5		0,5		2		2	
HRP-conj µg/mL		0,25		1		0,25		1	
Ácido ascórbico µM		600		600		600		600	
Cal.	Myo ng/ml								
		RLU	S/S0	RLU	S/S0	RLU	S/S0	RLU	S/S0
S1	11,4	45		113		159		361	
S2	57,2	11328	250	36861	325	43469	274	119387	330
S3	219	52303	1.154	32859 9	2.89 9	171988	1.08 4	990660	2.742
S4	830	70411	1.553	48110 9	4.24 5	220796	1.39 2	150759 1	4.172

[000226] Os ensaios foram realizados utilizando um instrumento de imunoenensaio automatizado modificado Dxl® (Beckman Coulter) como descrito acima.

H. Ensaios utilizando vários SSIA em ensaio de Tnl

[000227] Múltiplos níveis de concentração de 5 diferentes SSIA foram demonstrados no contexto de sistema de ensaio de Tnl de acordo com a presente descrição. As soluções concentradas de matéria-prima de ácido ascórbico, TROLOX, fenoxazina, 3-aminotirosina, e 2-aminofenol, todas disponíveis de Sigma Aldrich, foram preparadas em água deionizada em 100mM.

[000228] Em um tubo de reação, 400uL de conjugado de Tnl M6 anticorpo-HRP em 0,5 ug/mL em solução aquosa tamponada em pH. 8,0 (Tris a 100 mM, NaCl a 150mM, EDTA a 0,1mM, 0,2% de Tween-20 e 1% de BSA), 400uL de AK1~Dex70/31~estreptavidina (fração 1) 2:1 SA/Ab em 2ug/mL de Ab também em solução aquosa tamponada em pH 8,0, e 400uL de solução padrão de calibrador contendo o analito de Tnl em uma concentração conhecida. Um tubo foi preparado para cada concentração de calibrador. 75 uL da solução pré-misturada de conjugado de Ab-HRP, arcabouço e padrões form liberados por octapeto em cada cavidade de uma placa de microtítulo de polipropileno de 96 cavidades de Corning/Sostar (branca, Corning Cat. No 3355) e permitidos incubar durante 38-49 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, 25 uL de cada antioxidante como uma solução concentrada de 2mM, 1mM ou 0,5mM foram pipetados nas cavidades das placas utilizando uma pipeta de repetição. As placas foram giradas durante 10 segundos para misturar e incubadas entre 5 a 33 minutos. A detecção foi realizada com um luminômetro de placa de injeção SpectraMax L. As leituras de referência foram tomadas, seguidas por injeção de 100µL de Solução ativadora A em cada cavidade e leitura do sinal quimioluminescente.

Tabela 27: Sinal para Ruído e concentração final de SSIA em mistura de reação incluindo o volume de solução ativadora.

	DiH2O (controle)			Ácido ascórbico			Trolox		
Sinal/Ruído				500uM	250uM	125uM	500uM	250uM	125uM
S0/S0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
S1/S0	0,9	1,1	1,2	1,3	1,6	1,4	1,7	2,0	1,6
S2/S0	1,0	1,1	1,2	1,8	2,6	2,7	2,6	3,5	3,3
S3/S0	1,4	1,8	1,9	5,1	8,2	8,5	11,3	12,8	11,5

S4/S0	3,2	4,0	4,2	15,4	28,7	32,2	31,1	45,8	44,4
S5/S0	17,4	20,6	25,7	87,5	188,5	228,0	192,0	295,1	302,0
S6/S0	139,8	200,3	283,2	562,4	1511,1	2196,3	1181,7	2334,5	2713,1
	Fenoxazina			3-Amino Tirosina			2-Aminofenol		
	25uM	12,5uM	6,25uM	500uM	250uM	125uM	500uM	250uM	125uM
S0/S0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
S1/S0	1,3	1,5	1,5	1,1	1,7	1,5	1,3	0,9	1,4
S2/S0	1,6	2,3	3,1	1,9	2,7	2,8	1,8	1,7	2,3
S3/S0	3,7	6,4	8,4	5,9	8,1	9,0	4,8	4,5	7,6
S4/S0	12,1	24,5	32,1	19,8	31,1	32,2	10,8	15,4	27,2
S5/S0	62,8	147,2	227,2	118,6	217,9	234,8	52,5	101,7	183,7
S6/S0	387,3	1116,9	2049,8	766,3	1772,4	2268,7	329,9	739,1	1604,7

[000229] Conclusão: Todos SSIA testados neste formato de ensaio de fase de solução de Tnl representativo se comportaram eficazmente na melhora de sinal para ruído.

Exemplo 11: Preparação de sbp rotulado por quimioluminescente incluindo rótulo quimioluminescente, arcabouço PAA, e anticorpo acoplado à Estreptavidina-Biotina

[000230] Este exemplo descreve a formação de um arcabouço com um esqueleto de ácido poli(acrílico) acoplado a estreptavidina e conjugado a um anticorpo biotilado. O exemplo também descreve imunoensaio para um analito utilizando o arcabouço de PAA.

A. Rotulação para ácido poliacrílico (PAA) com composto quimioluminescente e biotina:

[000231] 2 mg de sal de sódio de ácido poliacrílico (PAA) (Polysciences, Warrington PA) foram dissolvidos em 0,4 mL de MÊS a 100 mM, pH 6,0. Cinquenta (50) equivalentes molares (20 mg) de EDC (Thermo Scientific) e 6 mg de N-hidroxissulfossucinimida (Thermo Scientific) foram dissolvidos em água deionizada e adicionados à solução de PAA, ao mesmo tempo em que misturando para ativar os grupos de carboxilato. Após 20 minutos de ativação, 50 equivalentes

molars (0,843 mg) de biotina-PEG4-hidrazida (Thermo Scientific), e 50 equivalentes molares (1,01 mg) de AK1-hidrazida preparado sem DMSO anidro, foram adicionados à solução de PAA e permitidos reagir durante a noite em temperatura ambiente com mistura. O PAA rotulado foi purificado por permuta de tampão em PBS, pH 7,2 utilizando um concentrador centrífugo de 10 kDa MWCO (Millipore, Billerica MA) e restaurado para o volume original em PBS após cinco (5) permutas. PAA rotulado por biotina e AK1 foi designado PAA-B.

B. Acoplamento de PAA rotulado com estreptavidina

[000232] Uma solução de 0,75 mg/mL de PAA rotulado por biotina- e AK1 (PAA-B) foi preparada em PBS, pH 7,4. 100 µL de PAA-B foram misturados com 13,75 µL de uma solução de 10 mg/mL de estreptavidina (Prozyme, Hayward CA), correspondendo a uma relação molar 2:1 de estreptavidina para PAA, e a mistura foi incubada durante a noite a 4°C.

C. Acoplamento de anticorpos biotinizados ao conjugado de estreptavidina-PAA para formar o arcabouço final

[000233] Anticorpos foram biotinizados como demonstrado nos exemplos anteriores. O arcabouço de PAA foi formado acoplando-se o conjugado de estreptavidina-PAA-B ao anticorpo incubando-se o conjugado de estreptavidina-PAA-B com anti-cTnI biotinizado a 4°C durante a noite. As relações molares de estreptavidina:anticorpo variaram de 1:1 a 1:4.

D. Imunoensaio para TnI com arcabouço de PAA

[000234] Os arcabouços de PAA são úteis em métodos de ensaio para detectar um analito tal como cTnI, como descrito no Exemplo 6. Um primeiro anticorpo para TnI foi conjugado para um arcabouço de PAA-AK1-estreptavidina, preparado como descrito acima, e fornecido em uma solução aquosa em 2 µg/mL. Um segundo anticorpo foi em seguida conjugado para HRP e fornecido em 0,5 µg/mL e uma solução

aquosa, como descrito no Exemplo 2.

[000235] O imunoensaio foi realizado como descrito no Exemplo 17. Brevemente, volumes iguais do arcabouço de PAA, conjugado de HRP, ácido ascórbico a 600 µM em água e a amostra do analito foram misturados juntos em placas de microtítulo de 96 cavidades.

[000236] As amostras de cTnI foram preparadas adicionando-se quantidades conhecidas de troponina I cardíaca nativa (Scipac; Sittingbourne UK) ao soro humano normal, como descrito no Exemplo 6. Brevemente, as concentrações conhecidas de TnI foram reforçadas em soro humano normal e analisadas de acordo com o ensaio descrito acima. Os dados podem ser utilizados para gerar uma curva de calibração para análise de TnI em concentrações desconhecidas.

TABELA 28.

PAA-B				
		Entrada	AK1:biotina= 50/50	
		Amostra B-1		
		Entrada 2 SA/PAA		
		b Saída 2 SA/PAA		
	Entrada de Btn-Aby/SA	1:1	1:2	1:4
Tri ng/mL				
		Média	Média	Média
S0	0	3.574	4.446	5.884
S1	0,1	5.492	4.620	7.191
S2	0,22	7.540	7.889	9.457
S3	0,82	14.731	14.295	20.570
S4	2,3	35.257	42.840	48.462
S5	9,2	136.677	144.827	184.274
S6	41	623.412	624.243	801.758
S7	190	2.259.096	2.303.353	2.773.923
		% de CV	% de CV	% de CV
S0	0	--	13,9%	5,2%
S1	0,1	11,2%	29,3%	7,7%

S2	0,22	15,5%	5,5%	3,3%
S3	0,82	20,9%	17,2%	-
S4	2,3	13,5%	4,5%	13,0%
S5	9,2	13,9%	7,4%	3,5%
S6	41	1,9%	0,9%	1,4%
S7	190	2,4%	0,5%	2,5%
		S/S0	S/S0	S/S0
S0	0	1,00	1,00	1,00
S1	0,1	1,54	1,04	1,22
S2	0,22	2,11	1,77	1,61
S3	0,82	4,12	3,22	3,50
S4	2,3	9,86	9,64	8,24
S5	9,2	38,24	32,58	31,32
S6	41	174,42	140,41	136,26
S7	190	632,07	518,10	471,45

[000237] b: Saída (relação molar de SA:PAA) foi calculada de análise de cromatografia de exclusão de tamanho, utilizando-se estreptavidina como padrão.

Exemplo 12: Preparação de sbp rotulado por quimioluminescente, arcabouço de PAA, e anticorpo tiolado

[000238] Este exemplo descreve a preparação de um arcabouço PAA rotulado com AK1 e maleimida utilizando substância química de EDC e conjugado com anticorpo anti-TnI monoclonal (284) através de uma reação de tiol-maleimida. O exemplo também demonstra imunoenensaio para um analito utilizando o arcabouço de PAA.

A. Rotulação de PAA com composto quimioluminescente e reticulador heterobifuncional

[000239] PAA rotulado por AK1- e maleimida (peso em mol aproximado 225.000) foi preparado como descrito no Exemplo 11, exceto que 20 equivalentes molares de (N-[ácido k-maleimidoundecanoico]hidrazida) (Thermo Scientific), e 20

equivalentes molares de AK2, preparados em DMSO anidro, foram adicionados à solução e permitidos reagir 1 hora em temperatura ambiente com mistura. O PAA rotulado foi purificado por diálise contra PBS, pH 7,2 utilizando um Cassete de Diálise de 10 kDa de MWCO Slide-A-Lyzer® (Thermo Scientific). A concentração final de PAA foi 1,4 mg/ml, assumindo nenhuma perda de polímero durante a diálise.

B. Tioação de anticorpo monoclonal anti-Tnl (284)

[000240] Anticorpo monoclonal anti-Tnl (284) foi dializado contra MÊS a 100 mM, tampão de pH 6,0 antes do uso. O reagente de Traut (2-iminotiolano·HCl) (Thermo Scientific) foi dissolvido em água deionizada em uma concentração de 2 mg/mL. 6,4 mg de anticorpo em uma concentração de 3,2 mg/mL foram reagidos com 2,36 µL de 2-iminotiolano (10 equivalentes molares por equivalente de anticorpo) durante 1 hora, em temperatura ambiente. O anticorpo tiolado foi purificado utilizando coluna de dessalinização de PD-10 (GE Healthcare, Piscataway NJ) equilibradas com PBS, pH 7,2, e contendo EDTA a 1 mM.

C. Acoplamento de anticorpo tiolado ao PAA rotulado por AK1 e maleimida

[000241] 105 µL da solução de PAA rotulada por AK1 e maleimida, em uma concentração de 1,4 mg/ml, foram misturados imediatamente com 0,6 mg de anticorpo anti-Tnl monoclonal tiolado (284), em uma concentração de 3,8 mg/mL, correspondendo a 6 equivalentes de anticorpo por equivalente de PAA. A reação foi realizada a 4°C, e o produto de reação purificado por HPLC de exclusão de tamanho. As frações de HPLC individuais do pico do produto (denotadas Fr3, Fr4 e Fr5 na Tabela 29) foram avaliadas no imunoensaio.

D. Imunoensaio para anticorpo monoclonal anti-Tnl com arcabouço de PAA

[000242] Um imunoensaio para anti-Tnl monoclonal utilizando o

arcabouço de PAA rotulado por AK1 e maleimida foi realizado como descrito no Exemplo 20. Brevemente, volumes iguais do arcabouço de PAA rotulado por AK1 e maleimida, conjugado de HRP, ácido ascórbico a 600 μM em água e amostra foram misturados juntos em um vaso de reação durante 30 minutos. A mistura foi incubada com 100 μL de solução ativadora A, isto é a solução ativadora, para iniciar a reação quimioluminescente. Após a iniciação, as amostras foram lidas em um luminômetro de microplaca SpectraMax® L no modo cinético de leitura rápida, e sinais quimioluminescentes foram registrados durante um período de tempo de cerca de 0,12 a 0,21 segundos. Para cada amostra, cinco (5) leituras de valor de referência foram coletadas antes da iniciação por adição da solução ativadora. Os valores reportados na Tabela 29 são a soma de múltiplos pontos de dados.

TABELA 29.

		PAA-B			
		PAA-B Não purificado	Purificado por HPLC		
			Fr3	Fr4	Fr5
Tnl ng/mL		Média de RLU			
S0	0	10,808	9,733	9,821	11,971
S1	0,1	12,857	19,001	15,341	14,731
S2	0,22	16,997	23,737	22,343	20,105
S3	0,82	38,482	64,065	51,049	35,388
S4	2,3	165,357	341,500	242,947	175,005
S5	9,2	512,474	1,018,277	729,631	504,771
S6	41	2,692,899	5,704,473	4,617,038	3,186,736
S7	190	9,635,260	19,995,274	14,644,731	9,579,212
		S/S0			
S0	0	1,00	1,0	1,00	1,00
S1	0,1	1,19	1,95	1,56	1,23
S2	0,22	1,57	2,44	2,28	1,68

S3	0,82	3,56	6,58	5,20	2,96
S4	2,3	15,30	35,09	24,74	14,62
S5	9,2	47,41	104,62	74,30	42,17
S6	41	249,15	586,07	470,14	266,22
S7	190	891,46	2054,29	1491,23	800,23

Exemplo 13: Preparação de sbp rotulado por quimioluminescente incluindo rótulo quimioluminescente, polímero de automontagem, e anticorpo acoplado à estreptavidina-biotina

[000243] Nos seguintes exemplos, a estreptavidina rotulada por AK1 é misturada com ácido poliacrílico biotinilado (PAA), e os complexos de polímero se formam por automontagem. Estes polímeros de automontagem funcionam como materiais de arcabouço para imunoenensaio de um analito.

A. Preparação de PAA biotinilado

[000244] Estreptavidina rotulada por AK1 e anticorpo cTnI 284 monoclonal biotinilado foram preparados de acordo com os métodos descritos no Exemplo 6.

[000245] 200mg de 225kDa de sal de sódio de ácido poli(acrílico) foram dissolvidos em 70mL de MES a 100 mM, pH 6,0. Para ativar os grupos de carboxilato, 2g de cloridrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida e 0,9g de N-hidroxissulfossucinimida) foram dissolvidos em 19 mL de água deionizada e adicionados à solução de PAA ao mesmo tempo em que misturando. Após 20 minutos de ativação, 45mg de biotina-PEG4-hidrazida, preparada em uma concentração de 2,25 mg/mL em DMSO anidro, foram adicionados a solução de PAA e permitidos misturar durante a noite em temperatura ambiente. O PAA biotinilado foi em seguida dializado extensivamente contra água deionizada para remover os subprodutos da reação. Em seguida a análise, o polímero biotinilado foi secado em um concentrador SpeedVac® sob vácuo (Thermo/Savant) e o polímero seco (110 mg) foi dissolvido em PBS, pH 7,2 e uma concentração de

2mg/mL. A relação molar de biotina:PAA (25 biotina:PAA) foi determinada utilizando um kit de ensaio HABA comercial (Thermo Scientific).

Exemplo 14: Preparação de sbp rotulado por quimioluminescente incluindo rótulo quimioluminescente, polímero de automontagem com PAA.

[000246] Neste exemplo, ácido poliacrílico biotinilado (PAA) é utilizado para terminar a reação de polimerização dos complexos de polímero formados por automontagem, como descrito no Exemplo 6, e para estabilizar os polímeros após a formação. Brevemente, anticorpos biotinilados são montados com Estreptavidina rotulada por AK1 (como descrito anteriormente) em uma relação molar otimizada. O ácido poliacrílico biotinilado (PAA) é em seguida adicionado para estabilizar o polímero de automontagem.

A. Preparação de polímeros de automontagem

[000247] IgG biotinilado, em uma concentração de 2,66 mg/mL foi misturado com Estreptavidina rotulada por AK1, em uma concentração de 0,584 mg/mL, e preparado como descrito no Exemplo 7. Várias relações de IgG biotinilado:Estreptavidina rotulada por AK1, de 0,25 a 1,25, e as misturas foram permitidas incubar durante a noite a 4°C para permitir a automontagem.

B. Preparação de Construtos Híbridos

[000248] Os construtos automontados foram divididos em volume iguais, e PAA biotinilado foi adicionado, em várias relações molares de PAA:Estreptavidina, de 0 a 1. A reação foi realizada a 4°C e incubada durante a noite para formar construções de PAA híbridas estáveis.

C. Imunoensaio com arcabouço híbrido de PAA

[000249] Um imunoensaio para anti-Tnl monoclonal utilizando o arcabouço híbrido de PAA foi realizado como descrito no Exemplo 11. Brevemente, volumes iguais do arcabouço de PAA, conjugado de

HRP, ácido ascórbico a 600 mM em água e amostra foram misturados juntos em um vaso de reação. A mistura foi incubada com solução ativadora A, isto é uma solução ativadora, para iniciar a reação quimioluminescente. Após o início da reação quimioluminescente, as amostras foram lidas em um luminômetro de microplaca SpectraMax® L no modo cinético de leitura rápida, e sinal de quimioluminescente foram registrados durante um período de tempo de cerca de 0,12 a 0,21 segundos. Resultados do imunoenensaio são mostrados nas Tabelas 30A–30E.

TABELA 30A.

	0,25 IgG/SA				
	0 SA/PAA	1 SA/PAA	3 SA/PAA	5 SA/PAA	8 SA/PAA
[Tnl] (ng/ml)	Média de RLU				
0	4.184	12.552	11.331	8.499	6.145
0,1	5.840	10.503	12.116	7.278	8.194
0,22	6.058	17.389	21.921	14.556	10.590
0,82	16.343	38.439	59.271	36.347	26.149
2,3	36.477	113.140	162.263	114.143	80.147
9,2	142.955	457.276	700.534	460.856	326.085
41	783.310	2.476.519	4.488.906	2.856.273	2.580.275
190	3.167.727	10.178.765	21.747.411	15.590.607	12.600.311
	S/S0				
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0,1	1,40	,84	1,07	0,86	1,33
0,22	1,45	1,39	1,93	1,71	1,72
0,82	3,91	3,06	5,23	4,28	4,26
2,3	8,72	9,01	14,32	13,43	13,04
9,2	34,17	36,43	61,82	54,23	53,06
41	187,20	197,31	396,15	336,09	419,88
190	757,06	810,95	1,919,23	1,834,48	2,050,39

TABELA 30B

	0,5 IgG/SA				
	0 SA/PAA	1 SA/PAA	3 SA/PAA	5 SA/PAA	8 SA/PAA
[Tnl] (ng/ml)	Média de RLU				
0	4.010	5.884	7.540	8.019	6.538
0,1	4.620	8.106	11.375	11.201	9.588
0,22	6.799	11.811	14.992	22.488	21.006
0,82	14.687	31.378	52.603	67.028	57.876
2,3	50.685	104.118	148.838	249.794	204.284
9,2	188.943	417.949	603.279	1.170.506	1.092.619
41	1.221.385	2.765.122	6.039.909	15.913.289	15.048.299
190	6.571.327	15.707.578	96.187.150	205.809.423	156.927.524
	S/S0				
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0,1	1,15	1,38	1,51	1,40	1,47
0,22	1,70	2,01	1,99	2,80	3,21
0,82	3,66	5,33	6,98	8,36	8,85
2,3	12,64	17,70	19,74	31,15	31,25
9,2	47,12	71,03	80,01	145,96	167,13
41	304,59	469,95	801,06	1.984,38	2.301,82
190	1.638,76	2.669,60	12.757,11	25.664,37	24.004,00

TABELA 30C

	0,75 IgG/SA				
	0 SA/PAA	1 SA/PAA	3 SA/PAA	5 SA/PAA	8 SA/PAA
[Tnl] (ng/ml)	Média de RLU				
0	7.366	8.019	7.801	9.196	9.893
0,1	10.590	11.811	13.075	16.343	14.818
0,22	22.183	25.495	28.981	35.649	40.095
0,82	73.087	79.580	112.182	131.969	144.261
2,3	285.152	259.992	363.097	445.898	573.885
9,2	2.447.372	1.372.384	2.049.153	2.620.363	3.844.405
41	43.338.476	13.828.384	33.016.180	59.347.317	89.147.402

190	168.827.565	79.333.148	184.698.375	304.942.403	279.613.531
	S/S0				
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0,1	1,44	1,47	1,68	1,78	1,50
0,22	3,01	3,18	3,71	3,88	405
0,82	9,82	9,92	14,38	14,35	14,58
2,3	38,71	32,42	46,54	48,49	58,01
9,2	332,27	171,14	262,67	284,95	388,59
41	5.883,92	1.724,40	4.232,10	6.453,66	9.010,98
190	22.921,17	9.892,82	23.675,12	33.160,62	28.263,20

TABELA 30D

	1 IgG/SA				
	0 SA/PAA	1 SA/PAA	3 SA/PAA	5 SA/PAA	8 SA/PAA
[Tnl] (ng/ml)	Média de RLU				
0	9.457	6.843	8.194	8.586	9.152
0,1	19.481	13.815	14.948	18.217	18.696
0,22	49.203	36.870	41.969	51.252	48.593
0,82	168.105	91.086	119.984	139.685	138.246
2,3	627.056	430.593	564.030	695.181	704.733
9,2	4.694.988	1.736.105	2.366.367	3.202.127	3.633.556
41	91.062.483	17.583.497	35.058.831	58.755.998	70.824.415
190	331.954.679	132.619.201	293.094.757	375.459.073	375.947.567
	S/S0				
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0,1	2,06	2,02	1,82	2,12	2,04
0,22	5,20	5,39	5,12	5,97	5,31
0,82	17,77	13,31	14,64	16,27	15,11
2,3	66,30	62,93	68,84	80,97	77,00
9,2	496,44	253,72	288,81	372,96	397,01
41	9.628,70	2.569,70	4.278,81	6.843,39	7.738,39
190	35.099,97	19.381,36	35.771,23	43.730,22	41.076,66

TABELA 30E

	1,25 IgG/SA				
	0 SA/PAA	1 SA/PAA	3 SA/PAA	5 SA/PAA	8 SA/PAA
[Tnl] (ng/ml)	Média de RLU				
0	11.506	6.407	9.065	10.068	6.450
0,1	25.626	13.467	16.735	16.256	14.295
0,22	58.835	30.202	34.909	38.177	22.837
0,82	207.685	85.595	103.378	104.467	67.074
2,3	872.612	363.237	493.264	499.806	311.519
9,2	10.022.572	1.959.241	2.419.036	3.012.092	1.637.333
41	148.756.072	27.487.732	40.916.313	50.923.490	15.755.349
190	459.829.313	135.376.541	230.820.255	242.615.955	55.732.378
	S/S0				
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0,1	2,23	2,10	1,85	1,61	2,22
0,22	5,11	4,71	3,85	3,79	3,54
0,82	18,05	13,36	11,40	10,38	10,40
2,3	75,84	56,70	54,41	49,65	48,29
9,2	871,10	305,81	266,85	299,19	253,83
41	12.928,95	4.290,39	4.513,57	5.058,20	2.445,64
190	39.965,50	21.130,07	25.462,28	24.098,88	8.640,14

Exemplo 15: Preparação de sbp rotulado por quimioluminescente incluindo rótulo quimioluminescente, conjugado de HRP polimérico e anticorpo acoplado à Estreptavidina-Biotina

[000250] Este exemplo demonstra a preparação de conjugados poliméricos de IgG e a enzima peroxidase de rábano silvestre (HRP) e seu uso como materiais de arcabouço para imunoenaios de fase de solução.

A. Preparação de conjugado de conjugado de HRP-IgG

[000251] Para oxidação de periodato da enzima, HRP foi dissolvido em água em uma concentração de 10 mg/mL. 100 µL de periodato de sódio a 0,088M recentemente preparado foram adicionados ao HRP

com agitação a 4°C e permitido reagir durante o tempo apropriado (isto é 20 a 40 minutos). A reação de oxidação foi extinta pela adição de um diol, tal como etileno glicol, e permitida incubar durante um adicional de 20 minutos a 4°C. A enzima oxidada foi dessalinizada em uma coluna PD10 e eluída em um tampão de reação apropriada, tal como PBS, para separar a enzima de oxidação em excesso e reagentes de extinção.

[000252] Os conjugados de HRP oxidado com IgG foram preparados por aminação reductiva. IgG foi misturado com HRP oxidado em uma relação em volume de 1:1 e uma relação molar de 1: 4–15 de IgG para HRP. A mistura foi permitida reagir durante duas horas durante a noite em temperatura ambiente. 10 µL de boroidreto a 5M foram adicionados e permitidos reagir durante 30 minutos em temperatura ambiente. O produto de reação foi dialisado ou separado por dessalinização para remover o reagente de redução em excesso. O produto foi em seguida separado aplicando-se o conjugado a uma coluna de SE HPLC e coletando-se os conjugados com peso molecular entre 450 e 1500 KDa. As relações de HRP:IgG foram avaliadas, e os conjugados são testados em um imunoenensaio SPARCL de fase de solução SpectraMax® padrão.

[000253] Os imunoenseaios para um analito específico, tais como Troponina I cardíaca (cTnI), foram realizados como descrito no Exemplo 11 utilizando o conjugado A, B, or C como descrito abaixo. Brevemente, volumes iguais de IgG (33 µg/mL), o conjugado HRP A, B, ou C (5 mg/mL), ácido ascórbico a 500 µM em água, e amostra foram misturados juntos em placas de microtítulo de 96 cavidades. A mistura foi incubada com solução ativadora A, isto é uma solução ativadora, para iniciar a reação quimioluminescente. Para estes ensaios, anticorpo monoclonal cTnI M06 foi dessalinizado em tampão de bicarbonato a 100 mM pH 9,6 com uma concentração final de 1–10 mg/mL. Tabela 31 mostra os resultados de imunoenensaio para cTnI

utilizando os conjugados de HRP poliméricos A, B, ou C. Estes conjugados foram preparados substancialmente como descrito abaixo:

B. Preparação de anticorpo cTnl monoclonal para conjugação para HRP oxidado

[000254] Antes da conjugação com HRP oxidado, o anticorpo cTnl monoclonal teve tampão permutado em PBS, pH 7,2 (Conjugados A&B) ou carbonato de sódio, pH 9,6 (Conjugado C).

C. Conjugados A e B: Oxidação de HRP

[000255] HRP foi dissolvido em água em 5 mg/mL. 100 µL de periodato de sódio recentemente preparado em uma concentração de 8,74 mg/ mL (0,088M) foi adicionado a cada mililitro de HRP com agitação a 4°C. A mistura foi permitida reagir durante o tempo apropriado. Para conjugado A, o tempo de reação foi aproximadamente 20 minutos, e para conjugado B, aproximadamente 40 minutos. Para cada 5 mg de HRP, 17 µL de etileno glicol foram adicionados e incubados durante um adicional de 20 minutos a 4°C. para extinguir a reação de oxidação.

[000256] 1,0 mL de enzima oxidada foi dessalinizado em uma coluna PD10 equilibrada em PBS pH 7,2 para remover os reagentes de extinção e oxidação em excesso.

D. Conjugação com IgG

[000257] Para conjugados A e B, 2,5 mg de HRP oxidado foram reagidos com 0,4695 mL (2,5 mg) de IgG. Os conjugados foram permitidos reagir durante a noite. 10 µL de 4 mg/mL de boroidreto de potássio foram recentemente preparados e 10 µL desta solução foram adicionados a cada mililitro da mistura de reação. A reação foi permitida prosseguir durante 30 minutos em temperatura ambiente com inversão contínua lenta. A mistura de produto foi em seguida separada dessalinizando-se em PBS para remover o excesso de reagente de redução. A concentração de IgG em seguida ao

procedimento de dessalinização foi 4,26 mg/mL para conjugados A e B. Em seguida a conjugação e redução, o produto foi separado aplicando-se o conjugado a uma coluna de HPLC de SE e coleando-se os conjugados com peso molecular entre 450 e 1500 KDa. As relações de HRP:IgG foram avaliadas como previamente descrito.

E. Conjugado C: Oxidação de HRP

[000258] HRP foi dissolvido em água em 5 mg/mL. 100 µL de periodato de sódio recentemente preparado em uma concentração de 8,74 mg/mL (0,088M) foi adicionado a cada mililitro de HRP com agitação a 4°C. A mistura foi permitida reagir durante 20 minutos. 17 µL de etileno glicol para cada 5 mg de HRP foram adicionados para extinguir a reação de oxidação, e a mistura foi permitida incubar durante um adicional de 20 minutos a 4°C.

[000259] 1,0 mL de enzima oxidada foi dessalinizado em uma coluna PD10 em um tampão de reação apropriado, tal como tampão de acetato a 1mM em pH 4,5, para separar a enzima de oxidação em excesso e extinguir os reagentes.

D. Conjugação com IgG

[000260] HRP oxidado foi conjugado com IgG por aminação reductiva. IgG foi misturado com o HRP oxidado em uma relação em volume de 1:1, em uma relação molar IgG:HRP de 1:4–15 e permitido reagir durante duas horas durante a noite em temperatura ambiente. Exatamente antes da reação de combinação, 100 µL de tampão de carbonato a 100mM em pH 9,6 foram adicionados a 1 mL de HRP oxidado. 1 mL de IgG foi misturado com o HRP oxidado em uma relação em volume de 1:1, em uma relação molar aproximada IgG:HRP de 1:4 HRP e permitido reagir durante um mínimo de duas horas. O intermediário de conjugado formado foi reduzido pela adição de 20 µL de boroidreto de potássio 4 mg/mL recentemente preparado. A redução foi permitida prosseguir durante 30 minutos em temperatura

ambiente com inversão contínua lenta. A mistura foi separada por dessalinização em PBS para remover o reagente de redução em excesso.

[000261] Em seguida a conjugação e redução, o produto foi separado aplicando-se o conjugado a uma coluna de HPLC de SE e coletando-se os conjugados com peso molecular entre 450 e 1500 KDa. As relações de HRP:IgG foram avaliadas como previamente descrito.

TABELA 31.

	[cTnI] ng/mL	STD HRP	A	B	C
s0	0	16.299	123.078	304.943	142.975
s1	0,039	28.111	277.115	610.073	225.401
s2	0,28	161.298	1.957.430	4.205.692	1.324.504
s3	1,04	531.785	22.820.047	47.324.173	15.879.973
s4	4,47	5.957.656	330.835.465	406.122.102	141.011.319
Razão					
No.					
1	s1/s0	1,7	2,3	2,0	1,6
2	s2/s0	9,9	15,9	13,8	9,3
3	s3/s0	32,6	185,4	155,2	111,1
4	s4/s0	365,5	2688,0	1331,8	986,3

[000262] Todas as publicações e pedidos de patentes nesta especificação são indicativos do nível de experiência ordinária na técnica a qual esta invenção pertence e são incorporadas aqui por referência em suas totalidades.

[000263] As várias modalidades descritas acima são fornecidas por modo de ilustração somente e não devem ser consideradas para limitar a invenção. Aqueles versados na técnica facilmente reconhecerão várias modificações e alterações que podem ser feitas para a presente invenção sem seguir as modalidades de exemplo e pedidos ilustrados e descritos aqui, e sem afastar-se do verdadeiro

espírito e escopo da presente invenção, que estão apresentados nas seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de ensaio para um analito em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende:

formar uma mistura de reação em uma solução aquosa, em qualquer ordem ou concorrentemente, adicionando-se

a amostra,

um par de ligações específico rotulado por quimioluminescente,

um par de ligações específico rotulado por ativador, em que o rotulado por ativador efetua a ativação do rotulado por quimioluminescente, e

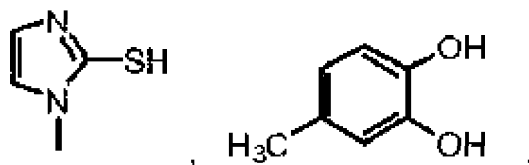
um agente de inibição de sinal seletivo,

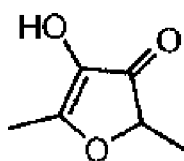
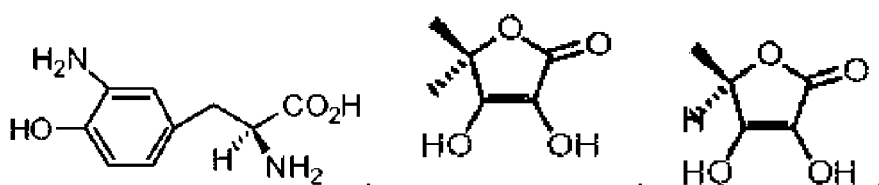
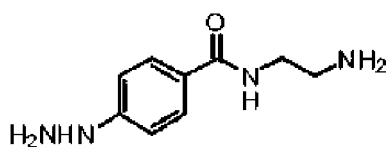
sendo que todos os componentes são solúveis em solução aquosa,

sendo que o par de ligações específico rotulado por quimioluminescente e par de ligações específico rotulado por ativador se ligam ao analito presente na amostra para formar um complexo de ligação;

adicionar à mistura de reação uma solução ativadora, sendo que a solução ativadora libera um sinal quimioluminescente detectável correlacionado com a quantidade do par de ligações específico ligado ao analito rotulado por quimioluminescente e par de ligações específico ligado ao analito rotulado por ativador na mistura de reação,

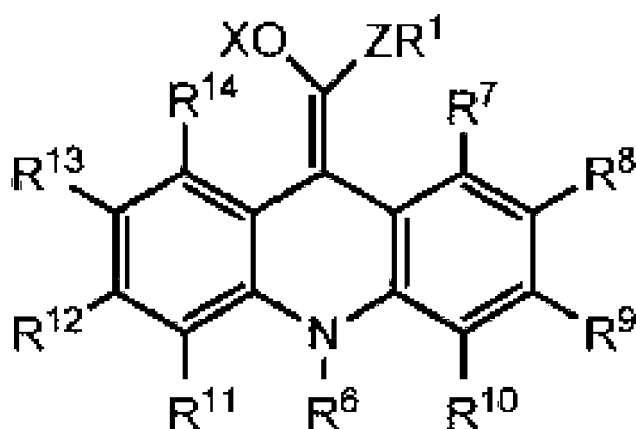
em que o agente de inibição de sinal seletivo é selecionado do grupo consistindo em:





, ácido ascórbico ou seus sais tal como sal de ascorbato de sódio e TROLOX,

em que o par de ligações específico rotulado por quimioluminescente compreende um composto com rótulo quimioluminescente conectado direta ou indiretamente a um membro de par de ligação específico, em que o rótulo quimioluminescente é selecionado de compostos de ceteno-dio-acetal de acridan, ésteres de acridan, tioésteres de acridan, sulfonamidas de acridan e derivados de acridan enol de fórmula VIII:



VIII

em que R¹ é selecionado de grupos alquila, alquenila, alquinila, arila, e aralquila de 1-20 átomos de carbono quaisquer dos quais podem ser substituídos com 1-3 grupos selecionados de grupos carbonila, grupos carboxila, grupos tri(C₁-C₈ alquil)silila, um grupo SO₃⁻

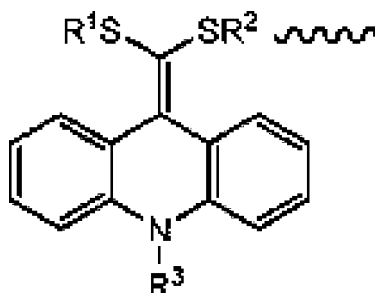
, um grupo OSO_3^{-2} , grupos glicosila, um grupo PO_3^- , um grupo OPO_3^{-2} , átomos de halogênio, um grupo hidroxila, um grupo tiol, grupos amino, grupos de amônio quaternário, ou grupos de fosfônio quaternário, sendo que X é selecionado de grupos $\text{C}_1\text{-C}_8$ alquila, arila, aralquila, grupos alquila ou aril carboxila tendo de 1-20 átomos de carbono, grupos $\text{tri}(\text{C}_1\text{-C}_8 \text{ alquil})\text{silila}$, um grupo SO_3^- , grupos glicosila e fosforila da fórmula $\text{PO}(\text{OR}')(\text{OR}'')$ sendo que R' e R'' são independentemente selecionados de grupos $\text{C}_1\text{-C}_8$ alquila, cianoalquila, arila e aralquila, trialquilsilila , cátions de metal de álcali, cátions alcalinoterrosos, cátions de $\text{trialquilsilfosfônio}$ e amônio, sendo que Z é selecionado de átomos O e S, sendo que R^6 é selecionado de grupos $\text{C}_1\text{-C}_4$ alquila substituída ou não substituída, fenila, benzila, alcoxialquila e carboxialquila, sendo que R^{7-14} são cada hidrogênio ou 1 ou 2 substituintes são selecionados de alquila, alcóxi, hidróxi, e halogênio e o restante de R^{7-14} é hidrogênio, ou em que cada de R^{7-14} é hidrogênio e R^1 é um substituinte de rotulação, ou em que um de R^{7-14} é um substituinte de rotulação e os outros de R^{7-14} são hidrogênio,

em que o par de ligações específico rotulado por ativador compreende um composto rótulo ativador conectado direta ou indiretamente a um membro de par de ligação específica, em que o rótulo ativador é selecionado de sais de metais de transição, complexos de metais de transição e enzimas, em que o rótulo ativador possui atividade de peroxidase, e

em que a solução ativadora compreende um composto de peróxido.

2. Método de ensaio de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o par de ligações específico rotulado por quimioluminescente compreende um composto com rótulo quimioluminescente conectado direta ou indiretamente a um membro de par de ligação específico, em que o rótulo quimioluminescente é um

composto cetenoditioacetal de acridan de fórmula



sendo que \sim designa o ponto de união do rótulo quimioluminescente ao membro de ligação específico, sendo que R^1 e R^2 são independentemente selecionados de grupos alquila substituídos ou não substituídos, alquenila substituídos ou não substituídos, alquinila substituídos ou não substituídos, arila substituídos ou não substituídos, e aralquila substituídos ou não substituídos de 1-20 átomos de carbono, sendo que quando R^1 e R^2 é um grupo substituído, pode ser substituído com 1-3 grupos selecionados de grupos carbonila, grupos carboxila, grupos tri(C_1 - C_8 alquil)silila, um grupo SO_3^- , um grupo OSO_3^{2-} , grupos glicosila, um grupo PO_3^- , um grupo OPO_3^{2-} , átomos de halogênio, um grupo hidroxila, um grupo tiol, grupos amino, um grupo $C(=O)NHNH_2$, grupos amônio quaternário, e grupos fosfônio quaternário, sendo que R^3 é selecionado do grupo consistindo em grupos alquila, alquila substituídos, alquenila substituídos ou não substituídos, alquinila substituídos ou não substituídos, arila substituídos ou não substituídos, aralquila substituídos ou não substituídos de 1-20 átomos de carbono, fenila, grupos benzila substituídos ou não substituídos, grupos alcoialquila, carboxialquila e ácido alquilsulfônico, sendo que quando R^3 é um grupo substituído, ele pode ser substituído com 1-3 grupos selecionados de grupos carbonila, grupos carboxila, grupos tri(C_1 - C_8 alquil)silila, um grupo SO_3^- , um grupo OSO_3^{2-} , grupos glicosila, um grupo PO_3^- , um grupo OPO_3^{2-} , átomos de halogênio, um grupo hidroxila, um grupo tiol, grupos amino, grupos amônio quaternário, e

grupos fosfônio quaternário.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o agente de inibição de sinal seletivo é selecionado do grupo consistindo em ácido ascórbico, Trolox, fenoxazina, 3-aminotirosina e 2-aminofenol.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o composto de rótulo ativador é uma enzima peroxidase.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que pelo menos um do par de ligações específico rotulado por quimioluminescente e par de ligações específico rotulado por ativador compreende uma substância auxiliar selecionado de proteínas solúveis, estreptavidina, avidina, neutravidina, biotina, BSA cationizado, fos, jun, dendrímeros sintéticos solúveis, polímeros sintéticos solúveis, polímeros naturais solúveis, polissacarídeos, dextrano, oligonucleotídeos, lipossomas, micelas e vesículas.

6. Método de ensaio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que formar uma mistura de reação, em qualquer ordem ou concorrentemente, ainda inclui adicionar um realçador, em que o realçador é um composto ou mistura de compostos que promove a regeneração catalítica de um ativador tendo atividade de peroxidase, opcionalmente em que o realçador é selecionado de compostos de fenol, aminas aromáticas, benzoxazóis, hidroxibenzotiazóis, ácidos aril borônicos e misturas dos mesmos.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a solução ativadora compreende um realçador selecionado de compostos de fenol, aminas aromáticas, benzoxazóis, hidroxibenzotiazóis, ácidos aril borônicos e misturas dos

mesmos.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o par de ligações específico rotulado por quimioluminescente compreende um rótulo quimioluminescente conectado a um análogo do analito e sendo que o analito e o análogo rotulado por quimioluminescente compete para se ligar ao par de ligações específico rotulado por ativador.

9. Kit para detectar um analito em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende:

um primeiro par de ligações específico para o analito;

um composto quimioluminescente conjugado para o primeiro par de ligações específico;

um segundo par de ligações específico para o analito; e

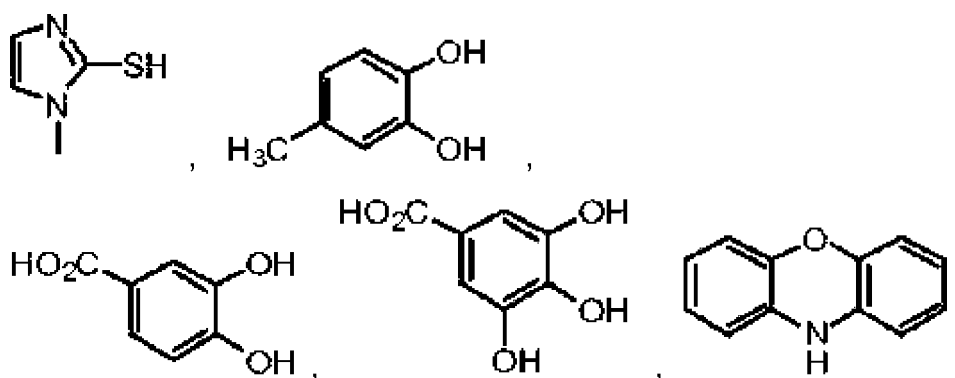
um composto ativador conjugado para o segundo par de ligações específico, em que o rotulado por ativador efetua a ativação do rotulado por quimioluminescente;

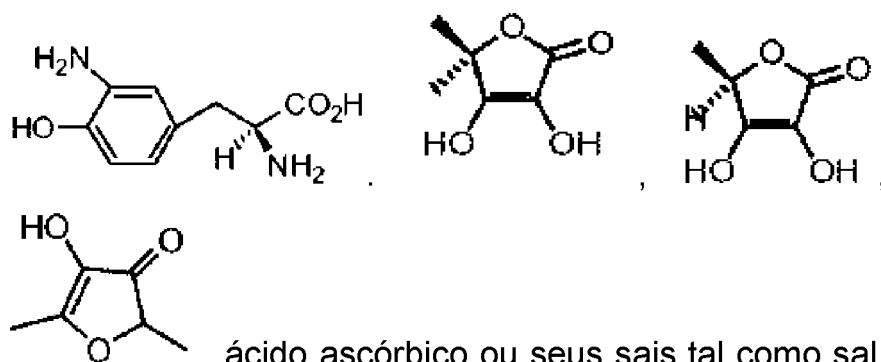
um agente de inibição de sinal seletivo; e

uma solução ativadora, sendo que a solução ativadora proporciona o reagente necessário para gerar o estado de excitação do composto necessário para a quimioluminescência,

em que todos os componentes são solúveis em solução aquosa,

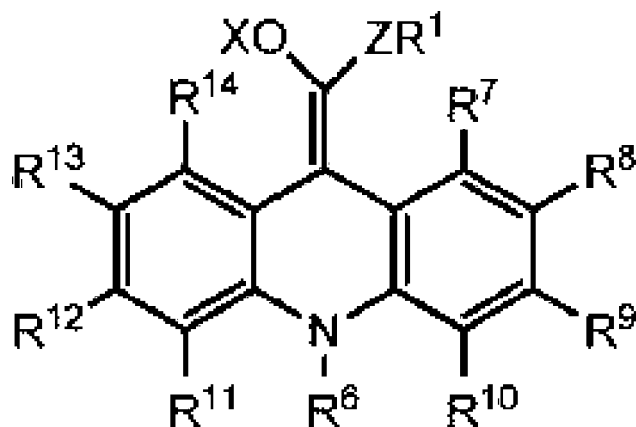
em que o agente de inibição de sinal seletivo é selecionado do grupo consistindo em:





, ácido ascórbico ou seus sais tal como sal de ascorbato de sódio e TROLOX, fenoxazina, 3-aminotirosina e 2-aminofenol, em que:

em que o composto quimioluminescente é selecionado de compostos de cetenodio-acetal de acridan, ésteres de acridan, tioésteres de acridan, sulfonamidas de acridan e derivados de acridan enol de fórmula VIII:



VIII

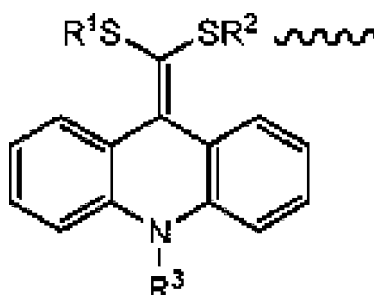
em que R^1 é selecionado de grupos alquila, alquenila, alquinila, arila, e aralquila de 1-20 átomos de carbono quaisquer dos quais podem ser substituídos com 1-3 grupos selecionados de grupos carbonila, grupos carboxila, grupos tri(C_1 - C_8 alquil)silila, um grupo SO_3^- , um grupo OSO_3^{2-} , grupos glicosila, um grupo PO_3^- , um grupo OPO_3^{2-} , átomos de halogênio, um grupo hidroxila, um grupo tiol, grupos amino, grupos de amônio quaternário, ou grupos de fosfônio quaternário, sendo que X é selecionado de grupos C_1 - C_8 alquila, arila, aralquila, grupos alquila ou aril carboxila tendo de 1-20 átomos de carbono,


grupos tri(C₁-C₈ alquil)silila, um grupo SO₃⁻, grupos glicosila e fosforila da fórmula PO(OR')(OR'') sendo que R' e R'' são independentemente selecionados de grupos C₁-C₈ alquila, cianoalquila, arila e aralquila, trialquilsilila, cátions de metal de álcali, cátions alcalinoterrosos, cátions de trialquilfosfônio e amônio, sendo que Z é selecionado de átomos O e S, sendo que R⁶ é selecionado de grupos C₁-C₄ alquila substituída ou não substituída, fenila, benzila, alcoxialquila e carboxialquila, sendo que R⁷⁻¹⁴ são cada hidrogênio ou 1 ou 2 substituintes são selecionados de alquila, alcóxi, hidróxi, e halogênio e o restante de R⁷⁻¹⁴ é hidrogênio, ou em que cada de R⁷⁻¹⁴ é hidrogênio e R¹ é um substituinte de rotulação, ou em que um de R⁷⁻¹⁴ é um substituinte de rotulação e os outros de R⁷⁻¹⁴ são hidrogênio,

em que o composto ativador é selecionado de sais de metais de transição, complexos de metais de transição e enzimas, em que o rótulo ativador possui atividade de peroxidase, e

em que a solução ativadora compreende um peróxido selecionado de peróxido de hidrogênio, peróxido de uréia, e sais de perborato.

10. Kit de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o composto quimioluminescente é um composto de cetenoditioacetal de acridan de fórmula



sendo que  designa o ponto de união do rótulo quimioluminescente ao membro de ligação específico, sendo que R¹ e R² são independentemente selecionados de grupos alquila substituídos ou não substituídos, alquenila substituídos ou não

substituídos, alquinila substituídos ou não substituídos, arila substituídos ou não substituídos, e aralquila substituídos ou não substituídos de 1-20 átomos de carbono, sendo que quando R¹ ou R² é um grupo substituído, pode ser substituído com 1-3 grupos selecionados de grupos carbonila, grupos carboxila, grupos tri(C₁-C₈ alquil)silila, um grupo SO₃⁻, um grupo OSO₃⁻², grupos glicosila, um grupo PO₃⁻, um grupo OPO₃⁻², átomos de halogênio, um grupo hidroxila, um grupo tiol, grupos amino, um grupo C(=O)NHNH₂, grupos amônio quaternário, e grupos fosfônio quaternário, sendo que R³ é selecionado do grupo consistindo em grupos alquila, alquila substituídos, alquenila substituídos ou não substituídos, alquinila substituídos ou não substituídos, arila substituídos ou não substituídos, aralquila substituídos ou não substituídos de 1-20 átomos de carbono, fenila, grupos benzila substituídos ou não substituídos, grupos alcoxialquila, carboxialquila e ácido alquilsulfônico, sendo que quando R³ é um grupo substituído, ele pode ser substituído com 1-3 grupos selecionados de grupos carbonila, grupos carboxila, grupos tri(C₁-C₈ alquil)silila, um grupo SO₃⁻, um grupo OSO₃⁻², grupos glicosila, um grupo PO₃⁻, um grupo OPO₃⁻², átomos de halogênio, um grupo hidroxila, um grupo tiol, grupos amino, grupos amônio quaternário, e grupos fosfônio quaternário.

11. Kit de acordo com as reivindicações 9 ou 10, caracterizado pelo fato de que a solução ativadora compreende um realçador selecionado de compostos de fenol, aminas aromáticas, benzoxazóis, hidroxibenzotiazóis, ácidos aril borônicos e misturas dos mesmos.

12. Sistema para realizar o método de ensaio, como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende

os componentes do kit conforme definido em qualquer uma

das reivindicações 9 a 11,

um sistema de manuseio de fluido para liberação da amostra na mistura de reação,

um sistema de manuseio de fluido para liberação do par de ligações específico rotulado por quimioluminescente, o par de ligações específico rotulado por ativador, e agente de inibição de sinal seletivo na mistura de reação, e

um sistema de manuseio de fluido para liberação da solução ativadora na mistura de reação para liberar um sinal quimioluminescente; e

um sistema de detecção para detectar o sinal quimioluminescente, sendo que o sistema de manuseio de fluido para liberação de solução ativadora age de acordo com o sistema de detecção para medir o sinal quimioluminescente liberado em, e em seguida à ativação da injeção de fluido na mistura de reação.