

P - 35.334  
Pha -293-Sp



341257

## Memoria descriptiva

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de PHARMACIA AB

entidad / ~~de nacionalidad~~ sueca

con domicilio en Björkgatan 30, Uppsala, Suecia

por: "UN METODO PARA DETERMINAR PROTEINAS Y POLIPEPTIDOS"  
(Clase Internacional G01n B011)

18.7.67

- 1 -



La presente invención se refiere a un método para la determinación de proteínas y polipéptidos, por ejemplo hormonas proteínicas y polipeptídicas, en muestras acuosas, por ejemplo en flúidos corporales tales como el suero de la sangre o la orina, pero también en otras fuentes, tales como diferentes tipos de extractos glandulares. Un factor esencial del método es que la sustancia que ha de ser determinada es capaz de actuar como antígeno, es decir, es capaz de provocar la formación de anticuerpos contra sí misma en los animales.

La invención se caracteriza porque unas partículas de polímeros insolubles en agua a los que se han unido anticuerpos, por medio de enlaces covalentes, contra la proteína o polipéptido que ha de ser determinado, son puestas en contacto con la muestra y con una cierta cantidad de la proteína o polipéptido marcado o radiactivado con un isótopo radiactivo, con lo que las partículas, después de haber tenido lugar la reacción entre la proteína o el polipéptido y los anticuerpos unidos a las partículas, son separadas del líquido de muestra, y se determina la radioactividad del material en partículas y/o del líquido.

El método puede ser utilizado para determinaciones cualitativas y cuantitativas.

La invención se basa parcialmente en el conocimiento de que, en ciertas circunstancias, las proteínas y los polipéptidos son, en general, capaces de actuar como antígenos, es decir capaces de causar la formación de anticuerpos, y parcialmente en el hecho de que los métodos radioinmunológicos son muy sensibles y muy adecuados para determinar proteínas y polipéptidos diferentes, presentes

341257



en los flúidos corporales en concentraciones muy bajas.

Los métodos radioinmunológicos se basan en general en la capacidad de un anticuerpo para unirse a su antígeno proteínico, independientemente de si éste último está o no marcado o radioactivado con un isótopo radioactivo. La unión de antígenos de proteínas marcados y no marcados tiene lugar en proporción con la concentración de proteínas marcadas y no marcadas, respectivamente. Se mide la radioactividad de la proteína marcada que se une a los anticuerpos, y/o de la proteína marcada libre, en el líquido de muestra. La proporción de proteína competidora no marcada puede ser determinada a partir de los valores obtenidos por cálculo o por comparación directa con una curva normalizada o patrón.

En principio, los métodos radioinmunológicos pueden ser aplicados a las proteínas y polipéptidos que son antigénicos, capaces de ser purificados y de ser marcados con un isótopo radioactivo. La proteína unida al anticuerpo ha de ser separada de la proteína no unida. Este procedimiento de separación ha sido realizado previamente por un gran número de métodos diferentes, tales como cromatografía sobre papel, electroforesis, precipitación con una sal o alcohol etílico, precipitación de anticuerpos por medio de anticuerpos contra estos últimos, o filtración a través de un gel. Estos métodos son complicados, llevan tiempo, y no son prácticos ni de confianza en ensayos de rutina, por ejemplo en un laboratorio de un hospital ordinario.

La gran ventaja del método de la presente invención es que los anticuerpos se unen firmemente a un vehículo



lo insoluble, y que la proteína marcada, que en la determi-  
nación reacciona con los anticuerpos y se une a los mismos,  
puede ser así separada fácilmente de la proteína marcada  
que no es unida, por ejemplo por simple centrifugación, o  
5 filtración, siendo la separación insensible a las varia-  
ciones en las concentraciones de sal y de proteína del lí-  
quido dentro de límites fisiológicos. El ensayo es fácil  
de llevar a cabo, ya que pueden dosificarse previamente,  
en tubos de ensayo por ejemplo, cantidades conocidas de  
10 partículas, juntamente con anticuerpos unidos a las mismas  
y pueden ser almacenadas sin pérdida de su capacidad de  
unión o enlace. Todo el procedimiento, incluyendo la sepa-  
ración de las proteínas libres marcadas y de las proteínas  
marcadas unidas a los anticuerpos, puede ser realizado en  
15 un mismo tubo de ensayo, sin ninguna adición posterior de  
sustancias precipitantes o similares.

El método requiere acceso a la proteína o el po-  
lipéptido que han de ser determinados para producir anti-  
cuerpos, y posibilidad de preparar proteínas o polipépti-  
20 dos marcados con un trazador radioactivo, y también que  
sean adecuados para obtener disoluciones patrón normaliza-  
das, para obtener por ejemplo, curvas patrón.

Son ejemplos de proteínas y polipéptidos contra  
los cuales pueden obtenerse anticuerpos las proteínas del  
25 plasma, las enzimas y muchas hormonas. Ejemplos de estas  
hormonas son la insulina, las gonadotropinas, la hormona  
del desarrollo, la ACTH, la tirotropina y la parathormona.

Los anticuerpos contra la proteína o el polipép-  
tido pueden ser preparados por cualquier método conocido  
30 por se, por inmunización de animales utilizados para expe-



rimentación, por ejemplo por medio de inyecciones subcutáneas repetidas de pequeñas cantidades de la proteína o polipéptido antigénicos, combinados posiblemente con una sustancia de las llamadas auxiliares, tales como la emulsión de aceite mineral de Freund, en el animal. Los anticuerpos producidos en los animales pueden recuperarse del suero sanguíneo de los mismos. La fracción proteínica, que contiene el antisuero, puede ser recogida por métodos convencionales, por ejemplo precipitando el suero con cantidades adecuadas de una disolución acuosa saturada de sulfato de amonio.

La radioactivación de la proteína o polipéptido con un isótopo radioactivo puede efectuarse de una forma convencional, seleccionándose para este fin un isótopo adecuado, por ejemplo  $I^{125}$ ,  $I^{131}$ ,  $C^{14}$  ó  $H^3$ . Un isótopo particularmente adecuado es un isótopo radioactivo del yodo tal como el  $I^{125}$ , porque la radioactivación con este isótopo es simple, y porque, por ejemplo, muchos laboratorios de hospitales disponen ya del equipo necesario para medir este isótopo.

Como vehículos para los anticuerpos se utilizan partículas de polímeros insolubles en agua. El polímero se selecciona de modo que contenga grupos reactivos adecuados, o pueda ser provisto de los mismos, tales como grupos amino, grupos hidroxilo y grupos carboxílicos, para hacer posible una fácil unión de los anticuerpos al polímero por medio de puentes con enlaces covalentes.

Es particularmente adecuada la elección de partículas de polímeros que consten de una estructura reticular de tres dimensiones, mantenida por medio de enlaces co



valentes. Aun cuando son hinchables en agua, estas partículas son completamente insolubles en ella, y son por tanto incapaces de dejar en libertad cantidad alguna de material polimérico ni de la sustancia unida a las mismas por enlaces covalentes, por ejemplo durante las operaciones de lavado. Son ejemplos de estas partículas de polímeros los gránulos de copolímeros obtenidos por reticulación de sustancias que contienen una gran cantidad de grupos hidroxílicos, tales como los hidratos de carbono y los alcoholes de azúcares, como el dextrano, el almidón, las dextrinas y otros polisacáridos, y el poli(alcohol vinílico) con una sustancia bifuncional, por ejemplo sustancias bifuncionales del tipo X-R-Z, en las que, por ejemplo, X y Z son, cada uno de ellos, halógeno o un grupo epoxídico, y R es el radical de la sustancia bifuncional, por ejemplo un radical alifático que contiene de 3 a 10, inclusive, átomos de carbono.

Para este fin pueden utilizarse, por ejemplo, gránulos del producto Sephadex, disponible en el comercio, que es un dextrano reticulado con puentes de éter de glicerina, obtenido tratando dextrano con epiclorhidrina. El Sephadex y los productos obtenidos de una forma similar son gránulos del gel capaces de hincharse en agua, pero que son insolubles en ella. Contienen grupos hidroxilo, y por lo tanto pueden ser sustituidos fácilmente con otros grupos, por ejemplo grupos que contienen grupos amínicos o grupos carboxílicos, y son por tanto muy adecuados para formar puentes por enlaces covalentes con los anticuerpos.

Es adecuado escoger partículas pequeñas, de modo que se obtiene una amplia superficie de contacto.



Los anticuerpos se unen a dichas partículas de vehículo con enlaces covalentes en condiciones suaves, de modo que no disminuye sustancialmente la reactividad inmu-  
no-química de los anticuerpos. A causa de las uniones co-  
valentes, los anticuerpos no pueden aflojar su enlace y  
llegar a ser separados por lavado de las partículas. Se  
emplean grupos reactivos, tales como grupos amino, grupos  
hidroxilo y grupos carboxilo, para unir químicamente la  
proteína del anticuerpo con la partícula de polímero, es-  
tableciéndose un puente con enlaces covalentes entre la  
proteína del anticuerpo y la partícula del polímero, por  
ejemplo del tipo:

Anticuerpo - NH . CS . NH . Partícula de polímero

Anticuerpo - NH . CO . NH . Partícula de polímero

Anticuerpo - N = N - Partícula de polímero.

Además, en el análisis se utiliza, como patrón adecuado, una disolución de la proteína o polipéptido de concentración conocida.

Las determinaciones de radioactividad pueden llevarse a cabo por métodos conocidos, por ejemplo por medio de detectores de centelleo.

La cantidad de partículas con anticuerpos se selecciona teniendo en cuenta, entre otras cosas, el grado de sensibilidad requerido en el ensayo.

La cantidad de proteína o polipéptido marcado o radioactivado, por ejemplo hormona con  $I^{125}$ , añadida a la reacción, se selecciona de modo que, por ejemplo, pueda unirse a los anticuerpos aproximadamente 40-60 por ciento de la hormona marcada, cuando no hay presente hormona competitiva no marcada. La incubación se realiza preferiblemente

20.7.67

- 7 -

341257



te a temperaturas entre +4 y 37°C, y usualmente a temperatura ambiente. No es necesario que la reacción entre el antígeno y los anticuerpos llegue a ser completa. La reacción se interrumpe, por ejemplo, después de 24 horas, pero también puede ser interrumpida antes, por ejemplo después de 2 - 4 horas. Es importante que el tiempo y la temperatura de reacción sean iguales para las disoluciones de la muestra y las disoluciones normalizadas o patrón.

Como el método es simple, rápido y práctico, y da resultados del análisis exactos, es también muy adecuado para determinaciones cuantitativas de uso rutinario, y permite la determinación de incluso cantidades muy pequeñas de sustancias de muestra.

La invención será ilustrada más detalladamente en lo que sigue, con referencia ejemplos detallados.

#### EJEMPLO I

##### Determinación de gonadotropina en orina

###### A. Preparación de anticuerpos

Se inyectó por vía subcutánea a conejos 0,5 mg. de gonadotropina humana en 2 ml. de auxiliar de Freund. La inmunización fué repetida cada semana durante cuatro semanas. Una vez transcurrida una semana más, se extrajo sangre de los conejos y se recuperó antisuero de la sangre dejando que coagulase la misma, y separando los coágulos de sangre.

La fracción de anticuerpo fué precipitada a partir de este antisuero por tratamiento con una disolución acuosa saturada de sulfato de amonio, añadiéndose 2,5 ml. de la disolución saturada a 5 ml. de suero



El precipitado fué separado por centrifugación. El precipitado fué disuelto en agua, y se repitió dos veces el procedimiento de precipitación con disolución de sulfato de amonio, Después de la tercera operación de precipitación, el precipitado fué disuelto en 0,1 ml. de una disolución acuosa de carbonato de sodio e hidrógeno, después de lo cual tuvo lugar una diálisis frente disolución 0,1 M de carbonato de sodio e hidrógeno. Esta fracción de anticuerpo fué utilizada para la copulación o unión.

10 B. Preparación de partículas con anticuerpos unidos por enlaces covalentes.

Se utilizaron como material de partida partículas en forma de gránulos finos del producto Sephadex (G 25 superfino), siendo el producto dextrano reticulado con puentes de éter de glicerina, y sustituido con grupos p-nitro-fenoxi-hidroxi-propil-éter hasta un grado de sustitución de 200 micromoles de grupos nitro por gramo de sustancia seca. (El producto había sido obtenido haciendo reaccionar Spadex G25, superfino, con 2,3-epoxi-1-(4 nitrofenoxi)-propano en un medio alcalino). 10 gramos del producto de Sephadex sustituido fueron introducidos, juntamente con 50 ml. de agua, en un metraz de dos bocas, después de lo cual la temperatura de la mezcla fué mantenida a 35°C. La mezcla fué agitada, y al mismo tiempo se añadieron 25 ml. de una disolución acuosa 5 N de hidróxido de sodio y 6 gramos de ditionito de sodio para reducir los grupos nitro o grupos amino. Después de aproximadamente 30 minutos se añadieron 5 gramos más de ditionito de sodio. El procedimiento de reducción fué interrumpido después de aproximadamente 1 hora, después de lo cual tuvo lugar la



neutralización con ácido clorhídrico diluido, siendo separada la sustancia sólida por filtración, y lavada con agua destilada sobre un filtro de succión.

10 gramos del producto de Sephadex obtenido anteriormente, sustituido con grupos p-amino-fenoxi-hidroxi-propilo, fueron introducidos en un matraz de reacción, juntamente con 100 ml. de una disolución al 10 por ciento de tiofosgeno en tetracloruro de carbono. El matraz fué cerrado herméticamente con un obturador, y la mezcla fué agitada durante aproximadamente 2 horas. La mezcla obtenida fué enfriada en un baño de hielo, y después de abrió el matraz y se filtró el contenido. El residuo de filtración fue lavado con una disolución acuosa 0,1 molar de carbonato de sodio e hidrógeno, agua destilada y acetona. El residuo fué secado después en una estufa de secado a 60-80°C. El producto de Sephadex, obtenido según lo explicado anteriormente, sustituido con grupos p-isotiocianato-fenoxi-hidrosipropilo, fue hinchado en 30 ml. de una disolución acuosa 0,1 M de carbonato de sodio e hidrógeno. Fué conectado el agitador, y después se añadieron, gota a gota, 5 ml. de la disolución dializada de anticuerpo según A). La mezcla fué agitada durante 24 horas a 20°C, y después fué filtrada. El residuo del filtro fué lavado con disolución 0,5 M de carbonato de sodio e hidrógeno, para separar las sustancias no unidas químicamente. El producto puede ser secado cuidadosamente, por ejemplo por liofilización.

#### C. Preparación de gonadotropina marcada o radioactivada

Fué marcada gonadotropina humana con  $I^{125}$  según el método siguiente: 2 mC de  $I^{125}$ , en forma de INa, fueron oxidados con cloramina T en presencia de 5 microgramos de



gonadotropina, según el método explicado por Hunter y Greenwood (ref. Nature/Londres/ volumen 194/1962/ página 495).

Después de la radioactivación, fué añadido ditionito de sodio para convertir la cantidad restante de yodo en yoduro

5 soluble. La gonadotropina obtenida, marcada con  $I^{125}$ , fué

separada de los productos de bajo peso molecular por filtración sobre un gel sobre un copolímero de dextrano con

con epíclorhidrina (Sephadex G-50). La gonadotropina marcada de esta forma tiene una actividad específica de 200-300

10 nM por mg. 1 ml. de la fracción de proteína marcada fué re-

cogida en un pequeño recipiente que contenía 1/2 ml. de una disolución de albúmina de plasma de vacuno, que contenía

50 mg. por ml. La hormona marcada fué almacenada en ambiente frío, y diluída antes de ser utilizada.

15 D. Determinación

Los análisis se llevan a cabo de modo adecuado en tubos de vidrio o de plástico de 50 x 10 mm.

1) En cada uno de los tubos se introdujo 1 ml. de una suspensión de partículas de polímero (por ejemplo 1 mg/ml) a las que se habían unido los anticuerpos.

20

2) A uno de los tubos se añadieron 0,25 ml. de la muestra de orina que ha de ser sometida a ensayo.

3) De cada una de una serie de disoluciones patrón que tenían diferentes concentraciones de la hormona, por ejemplo 100, 50, 25, 10, 5 y 2,5 IE por litro y 0 IE por litro, se añadieron 0,25 ml. a 1 tubo.

25

4) La incubación tuvo lugar durante 24 horas a temperatura ambiente, siendo hechos girar lentamente

30

24.7.67

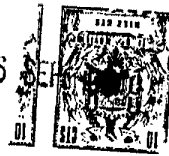


te los tubos durante el período de incubación.

- 5) A cada uno de los tubos se añadieron 0,1 ml de la disolución que contenía gonadotropina- $I^{125}$  (aproximadamente 1 milmillonésima de gramo (1/109 g) por ml).
- 6) La incubación tuvo lugar como en el punto 4, pero solamente durante cuatro horas.
- 7) Las partículas fueron centrifugadas a 3000 revoluciones por minuto durante 5 minutos.
- 10 8) Las partículas fueron lavadas dos veces con una disolución acuosa al 0,9 por ciento de cloruro de sodio. Después de la última separación por succión del líquido que sobrenadaba, los tubos fueron colocados en tubos contadores para estimar la radiación gamma procedente de la hormona marcada unida al anticuerpo.
- 15 9) El número de impulsos o centelleos durante un cierto tiempo para los tubos patrón normalizados fué representado en un diagrama impulsos-dosis sobre escala semilogarítmica, y de éste pudo ser calculada después la proporción gonadotropina en las muestras de ensayo desconocidas. Véase el diagrama 1, en el cual las ordenadas representan impulsos/min., y las abscisas IE/litro de gonadotropina.
- 20 25

De modo alternativo, después de la centrifugación en el punto 7), 1 ml de líquido que sobrenada transferido puede ser llevado a tubos de recuento, después de lo cual puede ser calculada la radiación gamma procedente de la hormona libre marcada. El recuento de impulsos procedentes de estos tubos patrón normalizados puede ser igualmente repre-

30



sentado en un diagrama de impulsos-dosis en escala semi-logarítmica, y puede calcularse después gráficamente la proporción de gonadotropina en las muestras de ensayo desconocidas, a partir de los puntos de unión o correspondencia, de la misma forma que anteriormente.

### EJEMPLO II

#### Determinación de la hormona del desarrollo en plasma sanguíneo.

##### A. Preparación de anticuerpos

10 Se inyectaron subcutáneamente a cobayas 0,5 mg de hormona humana del desarrollo en dos ml de sustancia auxiliar de Freund. La inmunización se repitió durante cuatro semanas, cada una de las semanas. Una vez transcurrida una semana más se extrajo sangre de las cobayas y  
15 se recuperó antisuero a partir de la sangre dejándola coagular, y separando los coágulos de sangre.

La fracción del anticuerpo fué precipitada a partir de este antisuero por tratamiento con una disolución acuosa de sulfato de antimonio saturado, añadiéndose 2,5  
20 ml de éste a 5 ml de suero.

El precipitado fué separado por centrifugación. El precipitado fué disuelto en agua, y se repitió dos veces el procedimiento de precipitación con disolución de sulfato de amonio. Después de la tercera operación de precipitación, el precipitado fué disuelto en 0,1 ml de una disolución acuosa de carbonato de sodio e hidrógeno, después de lo cual tuvo lugar una diálisis frente a una disolución 0,1 M de carbonato de sodio e hidrógeno. Esta fracción de anticuerpos fué utilizada para el acoplamiento o



unión.

B Preparación de partículas con anticuerpos unidos por enlaces covalentes

La preparación se lleva a cabo de la misma forma que en el caso del Ejemplo 1 B.

C. Preparación de hormona de desarrollo marcada o radioactivada

Se marcó hormona humana del desarrollo con  $I^{125}$  según el método siguiente: 2 mC de  $I^{125}$  en forma de INa fueron oxidados con Cloramina T en presencia de 5 microgramos de hormona de desarrollo, según un método explicado por Hunter y Greenwood (ref. Nature/Londres/ volumen 194/1962/pág. 495). Después de la radioactivación, se añadió ditionito de sodio para convertir la cantidad restante de yodo en yoduro soluble. La hormona de desarrollo marcada con  $I^{125}$  obtenida fue separada de los productos de peso molecular bajo por filtración por medio de un gel sobre un copolímero de dextrano con epiclorigidrina (Sephadex G-50). La hormona del desarrollo marcada de esta forma tiene una actividad específica de 200-300 mC por mg. 1 ml. de la fracción de proteínas marcada fué recogida en un pequeño recipiente que contenía 1/2 ml. de una disolución de albúmina de plasma de vacuno, que contenía 50 mg. por ml. La hormona marcada fué almacenada en ambiente frío, y diluida antes de ser utilizada.

D. Determinación

Los análisis se llevan a cabo de modo adecuado en tubos de vidrio o plástico de 50 x 10 mm.

1) En cada uno de los tubos se introdujo 1 ml. de una suspensión de partículas de polímero (p. ej.



1 mg./ml.) a las que se habían unido los anticuerpos.

- 2) A un tubo se añadieron 0,1 ml. del plasma que ha de someterse a ensayo.
- 5 3) De cada una de una serie de disoluciones patrón normalizadas que tenían diferentes concentraciones de la hormona, por ej. 20, 10, 5, 2, 1, 0,5 y 0,2 milmillonésimas de gramo, y 0 milmillonésimas de gramo, se añadieron 0,1 ml. a 1 tubo.
- 10 4) La incubación tuvo lugar durante 20 horas a temperatura ambiente, haciéndose girar lentamente los tubos durante el periodo de incubación.
- 5) A cada uno de los tubos se añadieron 0,1 ml. de la disolución que contenía hormona de desarrollo-  
15 I<sup>125</sup> (aproximadamente 2 milmillonésimas de gramo por ml.)
- 6) Se llevó a cabo la incubación como en el punto 4), pero sólo durante cuatro horas.
- 7) Las partículas centrifugadas a 4000 revoluciones  
20 por minuto durante 1 minuto.
- 8) Las partículas fueron lavadas dos veces con una disolución acuosa al 0,9 por ciento de cloruro de sodio. Después de la última separación por succión del líquido que sobrenadaba, los tubos fueron co-  
25 locados en tubos contadores para estimar la radiación gamma procedente de la hormona marcada unida a los anticuerpos.
- 9) El número de impulsos durante un cierto tiempo para los tubos patrón fué presentado en un diagrama de impulsos-dosis en una escala semilogarítmica  
30

26.7.67

341257

26 SEP. 1967



ca, a partir del cual pudo ser calculada después la proporción de hormona de desarrollo en las muestras de ensayo desconocidas, véase el diagrama 2, en el cual las ordenadas representan impulsos/10 min., y las abscisas ng por ml de hormona del desarrollo. Alternativamente, después de la centrifugación en el punto 7), puede ser transferido 1 ml del líquido que sobrenada a tubos de recuento, después de lo cual puede ser calculada la radiación gamma procedente de la hormona libre marcada. Del mismo modo, el recuento de impulsos procedentes de los tubos patrón puede ser representado en un diagrama de impulsos-dosis en una escala semi-logarítmica, y después puede estimarse gráficamente a partir de los puntos de intersección o de correspondencia, la proporción de la hormona de desarrollo en las muestras de ensayo desconocidas, de la misma forma que anteriormente.

### EJEMPLO III

#### Determinación de insulina en plasma sanguíneo

##### A. Preparación de anticuerpos

Se inyectaron por vía subcutánea a cobayas 0,5 mg de insulina de cerdo en 2 ml de auxiliar de Freund. La inmunización fue repetida durante cuatro semanas, cada una de ellas. Una vez transcurrida una semana más, se extrajo sangre de las cobayas y se recuperó el antisuero a partir de la sangre dejándola coagular, y separando los coágulos de sangre.

La fracción de anticuerpos fue precipitada a partir de este antisuero por tratamiento con una disolución



acuosa saturada de sulfato de amonio, añadiéndose 2,5 ml. de ésta última a 5 ml. de suero.

El precipitado fué separado por centrifugación. El precipitado fué disuelto en agua, y se repitió dos veces el procedimiento de precipitación con disolución de sulfato de amonio. Después de la tercera operación de precipitación, el precipitado fué disuelto en 0,1 ml. de una disolución acuosa de carbonato de sodio e hidrógeno, después de lo cual se llevó a cabo una diálisis frente a di- solución 0,1 M de carbonato de sodio e hidrógeno. Esta fracción de anticuerpos fué utilizada para el acoplamiento o unión.

B. Preparación de partículas de anticuerpos unidos por enlaces covalentes.

Esta preparación se llevó a cabo de la misma manera que en Ejemplo 1, B.

C. Preparación de insulina marcada

Fue marcada insulina de cerdo con  $I^{125}$  según el método siguiente: 2 mC de  $I^{125}$  en forma de INa fueron oxidados con Cloramina T en presencia de 5 microgramos de insulina, según un método explicado por Hunter y Greenwood (ref. Nature/Londres/volumen 194/1962/pág. 495). Después de la radioactivación, se añadió ditionito de sodio para convertir la cantidad restante de yodo en yoduro soluble. La insulina marcada con  $I^{125}$  obtenida fué mezclada con albúmina de plasma de vacuno, y separada de los productos de bajo peso molecular y de los productos de desnaturalización de la insulina unidos a la albúmina del plasma, por filtración a través de un gel sobre un copolímero de dextrano con epiclrorhidrina (Sephadex G-50). La insulina ra-



5 dioactivada o marcada de esta manera tiene una actividad específica de 100-200 mC por mg. El segundo máximo de la fracción de proteína marcada fué recogido en un pequeño recipiente que contenía 1/2 ml. de una disolución de albúmina de plasma, que contenía 50 mg. por ml. La hormona marcada fué almacenada en ambiente frío, y diluída antes de ser utilizada.

D. Determinación.

10 Los análisis se llevan a cabo de modo adecuado en tubos de vidrio o de plástico de 50 x 10 mm.

- 1) En cada uno de los tubos se introdujo 1 ml. de una suspensión de partículas de polímero (por ej. 1 mg/ml.) a las que se habían unido los anticuerpos.
- 15 2) A un tubo se añadieron 0,1 ml. del plasma que ha de someterse a ensayo.
- 3) De cada una de una serie de disoluciones patrón normalizadas que tenían diferentes concentraciones de la hormona, por ejemplo 200, 100, 50, 25, 10, 5 y 2,5 microE/ml. y 0 microE por ml., se añadieron 0,1 ml. a un tubo.
- 20 4) Se añadieron a cada uno de los tubos 0,1 ml. de una disolución que contenía insulina- $I^{125}$  (aproximadamente 1 milmillonésima de gramo por ml.).
- 25 5) Se llevó a cabo la incubación durante 20 horas a temperatura ambiente, ó a  $+4^{\circ}\text{C}$ , haciéndose girar lentamente los tubos durante el período de incubación.
- 30 6) Las partículas fueron centrifugadas a 4000 revoluciones por minuto durante 1 minuto.



las partículas fueron lavadas dos veces con una disolución acuosa al 0,9 por ciento de cloruro de sodio. Después de la última separación por succión del líquido que sobrenadaba, los tubos fueron colocados en tubos de recuento de centelleo para estimar la radiación gamma procedente de la hormona marcada unida a los anticuerpos.

8) En número de impulsos, durante un cierto tiempo, de los tubos patrón fué representado en un diagrama de impulsos-dosis sobre una escala semi-logarítmica, a partir del cual pueden calcularse después las cantidades de insulina en las muestras de ensayo desconocidas.

Véase el diagrama de la Figura 3, en el cual las ordenadas representan impulsos/5 min., y las abscisas  $\mu\text{U}/\text{ml}$  de insulina.

Alternativamente, después de la centrifugación en 7), puede ser transferido 1 ml del líquido que sobrenada a tubos contadores, después de lo cual puede ser calculada la radiación gamma procedente de la hormona marcada libre. Del mismo modo, el número de impulsos de estos tubos patrón puede ser representado en un diagrama impulsos-dosis en escala semilogarítmica, y después puede ser calculada gráficamente la proporción de insulina en las muestras de ensayo desconocidas, a partir de los puntos de unión o intersección, de la misma manera que anteriormente.

Esta solicitud que corresponde a la presentada en Suecia el 2 de Junio de 1966, bajo el número 7541/66, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

341257



N O T A

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

5 1.- Un método para determinar proteínas y polipéptidos, por ejemplo hormonas, en una muestra acuosa, que comprende poner en contacto partículas de polímeros insolubles en agua, a las que se han unido por medio de  
10 enlaces covalentes anticuerpos contra la proteína o el polipéptido que ha de ser determinado, con la muestra y con una cierta cantidad de la proteína o polipéptido radioactivado con un isótopo radioactivo, después de lo cual las partículas son separadas del líquido de muestra, después  
15 de haber tenido lugar la reacción entre la proteína y el polipéptido y los anticuerpos unidos a las partículas, y es determinada la radioactividad del material en partículas y/o en el fluido.

20 2.- Un método según se reivindica en la reivindicación 1, caracterizado porque la determinación se efectúa cuantitativamente.

3.- Un método para determinar proteínas y polipéptidos.

25 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan

27.4.68

341257



y con los fines que se han especificado.

La presente Memoria consta de veintiuna hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 2 MAY. 1968

P.A.

*Alfredo de Sotomayor*  
Alfredo de Sotomayor  
P.A.

341257