

P.- 39.891

Serial Nº 679.628

359805

**Memoria descriptiva**



para solicitar PATENTE DE INVENCION EN ESPAÑA por 20 años

a nombre de MILES LABORATORIES, INC.

entidad / de nacionalidad norteamericana

con domicilio en 1127 Myrtle Street, Elkhart, Indiana, Estados Unidos de América

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR UN REACTIVO PROTEINICO" (Clase Internacional G01n)

=====

5.12.68.



## FUNDAMENTOS DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a un reactivo químico insoluble en el que un material proteínico está unido químicamente a una partícula proteínica de soporte, y particularmente en el que el material proteínico es un material inmunológico y el reactivo resultante se utiliza para llevar a cabo ensayos inmunológicos.

Los reactivos químicos que contienen materiales proteínicos han sido empleados para usos tales como inmuno-adsorbentes, agentes de conversión enzimática, y reactivos de ensayos inmunológicos. En muchas de estas aplicaciones un material proteínico es adsorbido sobre la superficie de partículas de soporte, usualmente de forma de partículas, tales como glóbulos rojos, y sobre los glóbulos rojos que sirven de soporte al material proteínico adsorbido se hace pasar después un fluido que contiene el material que ha de ser tratado. Un problema en este tipo de aplicación es que el material proteínico adsorbido es arrastrado de la superficie de los glóbulos rojos y se confunde con el material que es tratado. Esto es particularmente molesto cuando son necesarios productos finales altamente purificados o cuando se lleva a cabo un ensayo inmunológico. En el caso de esta última aplicación, el material proteínico, un antígeno o un anticuerpo, es arrastrado de la superficie de la partícula de soporte, por ej. un glóbulo rojo, y provoca resultados falsos en el ensayo.

En la técnica anterior se ha intentado evitar la dificultad antes descrita disponiendo una unión química entre el material proteínico y la partícula de soporte o portadora. Estos agentes de unión, tales como el difluoro-

30  
5.12.68.



dinitrobenceno y diisocianato de tolueno han sido utiliza-  
dos para unir químicamente antígenos a glóbulos rojos. Es-  
tos agentes de unión son altamente reactivos y han de ser  
añadidos de una forma cuidadosamente controlada a los ma-  
5 teriales que han de ser unidos a ellos, para evitar pro-  
blemas tales como la unión de glóbulo con glóbulo. Otra  
desventaja es que no pueden ser empleados para preparar  
partículas portadoras con capacidad reactiva inducida ar-  
tificialmente que puedan ser almacenadas, transportadas y  
10 después unidas a materiales proteínicos.

Además, en la técnica anterior se ha expuesto  
que los compuestos tetrazotados reaccionan con el mate-  
rial proteínico (A.N. Howard y F. Wild: Biochemical Jour-  
nal, 65, 651, 1957), y que varios material proteínicos so-  
15 lubles, cuando son hechos reaccionar con estos compuestos  
tetrazotados, pueden ser unidos a otras proteínas solu-  
bles que han sido hechas pre-reaccionar con pirrol (A.N.  
Howard y F. Wild: Brit. J. Exptl. Pathol., 38, 640-3,  
1957). No obstante, no se ha observado que pueda utilizar-  
20 se una técnica de unión en tres fases para unir químicamente  
materiales proteínicos a partículas de soporte de modo  
que se formen reactivos proteínicos solubilizados al-  
tamente útiles.

Por lo tanto, es un objeto de esta invención  
25 proporcionar un procedimiento para producir un reactivo  
proteínico, en el que un material proteínico es tratado  
con, bien un compuesto tetrazotado o bien un compuesto re-  
ticulado que tiene un resto aromático que es más suscepti-  
ble de sustitución electrofílica que cualquier resto aromá-  
30 tico proteínico presente, y después es unido el resto de  
5.12.68.



estos dos compuestos a una partícula portadora, y finalmente se hacen reaccionar los dos materiales tratados para formar un reactivo proteínico útil.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un reactivo proteínico producido por el procedimiento anterior.

#### RESUMEN DE LA INVENCION

El material proteínico seleccionado para su conversión en una forma de reactivo sólido insolubilizado es disuelto en un medio líquido, y después tratado con uno de los dos compuestos siguientes: un compuesto tetrazotado o un compuesto reticulado que tiene un resto aromático que es más susceptible de sustitución electrofílica que cualquier resto aromático proteínico presente. Cualquiera de los dos reactivos reacciona con el material proteínico y se fija al mismo. El resto de estos dos componentes es unido después a una partícula portadora proteínica que tiene suficiente reactividad para reaccionar con dicho compuesto restante, y que está en forma insoluble. Los dos materiales así tratados son hechos reaccionar después entre sí por mezclado, de modo que los dos grupos azoicos que no han reaccionado de los restos del compuesto tetrazotado pueden reaccionar con el resto aromático del compuesto reticulado. El reactivo así formado contiene el material proteínico unido químicamente a la partícula proteínica portadora, que después presenta el material proteínico en una forma sólida, fija e insolubilizada para su reacción con otros materiales.

Como el resto aromático del compuesto reticulado es más susceptible de sustitución electrofílica que

30  
5.12.68.

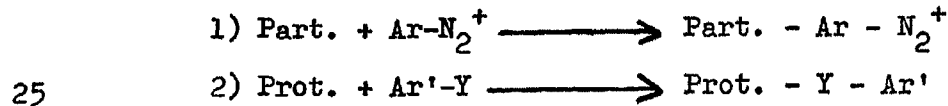


5 cualquier resto aromático presente, tanto en la particu-  
 la portadora como en el material proteínico que ha de ser  
 unido a ella, el grupo azoico del compuesto tetrazotado  
 reacciona preferentemente con el compuesto reticulado. El  
 resto de tirosina tiene la más alta susceptibilidad de  
 sustitución electríflica de las proteínas naturales, y  
 por tanto el resto aromático del compuesto reticulado ha  
 de tener mayor susceptibilidad que la tirosina.

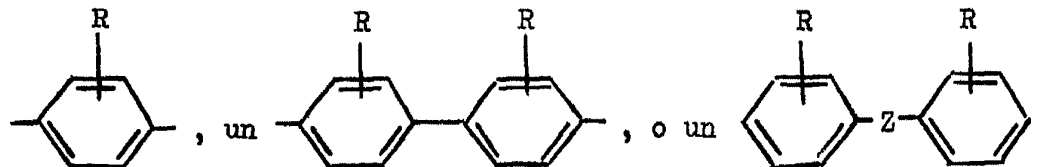
10 Las partículas de soporte pueden ser una par-  
 tícula revestida con proteína, tal como los glóbulos ro-  
 jos, las células microbianas, y partículas insolubles re-  
 vestidas con proteínas. Estas partículas son particular-  
 mente ventajosas si han de llevarse a cabo ensayos immuno  
 lógicos con el reactivo.

15 El material proteínico puede ser un antígeno,  
 un anticuerpo, o una enzima.

Las varias operaciones del procedimiento de  
 reacción implicadas en la producción del reactivo proteí-  
 nico de la presente invención pueden ser ilustradas ha-  
 ciendo referencia a la práctica preferida de hacer reac-  
 20 cionar el compuesto tetrazotado con la partícula de sopor-  
 te o portadora (Part.) y tratar el material proteínico  
 (Prot.) con el compuesto reticulado, como sigue



donde Ar es un grupo

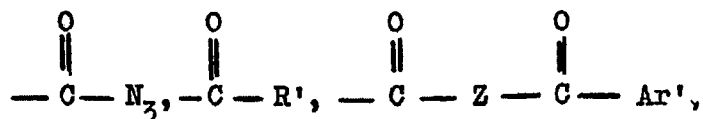


30  
 5.12.68.

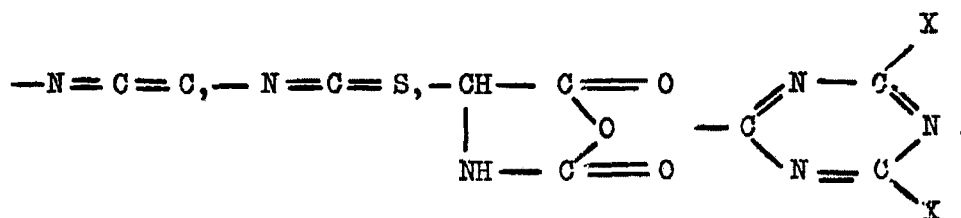


en el que R está seleccionado del grupo de H y grupos alcohilo, halógeno y alcoxilo, Z es un grupo -NR'-, -S- ó -O-, y R' está seleccionado del grupo de H y grupos alcohilo; Y es un grupo seleccionado de entre

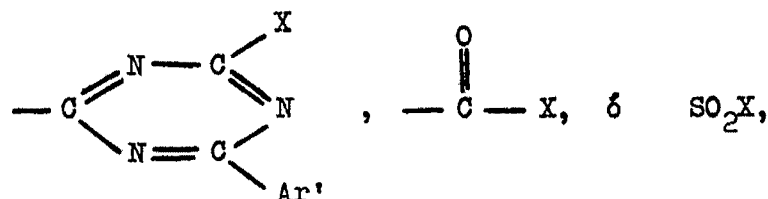
5



10

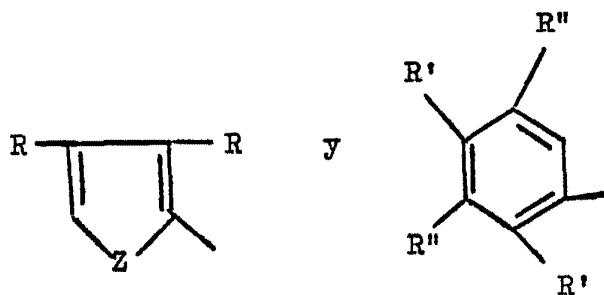


15



donde X es un grupo de halógeno; y Ar' está seleccionado del grupo de

20



25

en los que R' y Z tienen los mismos significados anteriores, y R'' es un grupo activador del anillo, tal como -OH, -OCH<sub>3</sub> y -NH-C(=O)CH<sub>3</sub>. La fórmula estructural Ar-N<sub>2</sub><sup>+</sup> del com-

puesto tetrazotado ilustrado en la reacción (1) anterior, se refiere a los compuestos aromáticos tetrazotados que tienen capacidad para unir químicamente proteínas entre

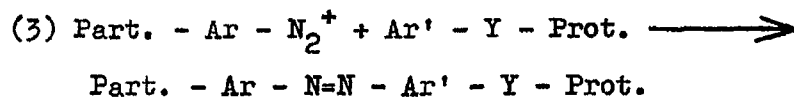
30  
5.12.68.



sí. Aunque este tipo de unión directa no está comprendido en ellos esta indicación de su significado es coextensiva de los compuestos tetrazotados utilizados.

5 Además de los compuestos reticulados anteriores, el resto Y de la ecuación (2) de reacción puede ser un grupo  $\begin{matrix} -C-OH, & -C-NHNH_2 & -NHNH_2 & \text{o} & -NH_2 \\ \parallel & \parallel & & & \\ O & O & & & \end{matrix}$ , en cuyo caso la reacción entre el compuesto reticulado y la proteína ha de ser activada por un activador de ácido carboxílico, tal como las carbodiimidas, etoxiacetileno, cianamidas, cete-  
10 noimidias, o sales de isoxazolio (reactivos de Woodward).

Los dos materiales tratados pueden ser hechos reaccionar después entre sí por mezclado a temperatura ambiente (25°C) en un medio líquido, según la ecuación final de reacción:



en la que los varios símbolos tienen los significados descritos anteriormente.

20 Así pues, el compuesto aromático tetrazotado empleado para la preparación del reactivo proteínico puede ser seleccionado del grupo de la bis-diazobencidina, bis-diazodianisidina, y 4,4-difenilamina tetrazotada, entre otros compuestos aromáticos tetrazotados que tienen  
25 capacidad para unir químicamente proteínas entre sí.

El compuesto reticulado mostrado en la ecuación (2) de reacción anterior como Ar'-Y, puede ser seleccionado preferiblemente del grupo de azida de ácido pirrol-2-carboxílico, azida de ácido tiofen-2-carboxílico, cloro de 2-tiofenosulfonilo, y ácido 2-furoico. Pueden emplear  
30  
5.12.68.



se igualmente otros compuestos reticulados de esta naturaleza comprendidos por la fórmula estructural expuesta anteriormente, tales como el anhídrido 2-furoico; 2,4-dinitoxibenzaldehído; isotiocianato de 3-metil-2-tiofeno; N-metil-2-pirrol oxazolidina-2,5-diona; y N-(4,6-dicloro-1,3,5-triazinil-2)-2,4-diacetilamino anilina.

El procedimiento para producir el reactivo proteínico de la presente invención puede ser efectuado bajo condiciones muy suaves, tales como temperatura ambiente, y puede ser llevado a cabo en un medio líquido tampón, tal como un medio tamponado con fosfato, o en una disolución salina empleando sólo una ligera agitación. A causa del carácter único del método de reacción en tres fases ilustrado por las ecuaciones de reacción (1), (2) y (3) anteriores, no se requieren condiciones de reacción de baja temperatura especialmente controladas, y no hay necesidad de llevar a cabo las reacciones de una forma especialmente controlada, tal como tener la partícula portadora y el material proteínico que ha de ser unido a ella en el mismo medio líquido y al mismo tiempo antes de la adición del compuesto tetrazotado y el compuesto reticulado.

Una vez efectuada la reacción (3), el reactivo proteínico formado puede ser recuperado del medio líquido y preparado en forma seca, en la que es estable y no se desnaturaliza ni se estropea. Es particularmente deseable una forma seca y estable de reactivos proteínicos, desde el punto de vista de la producción de materiales reactivos enzimáticos comercialmente aceptables y reactivos para ensayos inmunológicos. La separación del medio líquido del

30  
5.12.68.



indicador proteínico puede ser conseguida por medio de un procedimiento de secado por pulverización a baja temperatura, o por un procedimiento de liofilización.

5 Cuando las partículas portadoras para el material proteínico han de ser glóbulos rojos, pueden ser extraídos de un amplio número de animales. Ejemplos de glóbulos rojos de animales que pueden ser empleados son los de la zarigüeya, rata, conejo, cobaya, sangre humana, cabra, oveja, pollo, caimán y tortuga de mar. La forma de  
10 recoger los glóbulos rojos es extraer una muestra de sangre del animal y separar después por centrifugación los glóbulos rojos del suero. Después, los glóbulos rojos son recogidos y almacenados en disolución salina fisiológica antes de su tratamiento con el compuesto tetrazotado o el  
15 compuesto reticulador como se ha expuesto anteriormente. Si se desea, los glóbulos pueden ser protegidos con formaldehído o fenol.

Las células microbianas empleadas como partículas de soporte pueden ser cualquier microorganismo auto-  
20 -reproductor que se propague dependiendo o no de otros organismos. Pueden utilizarse tanto células bacterianas gram positivas como gram negativas. Pueden emplearse igualmente células de hongos y células de protozoos, así como partículas de virus. Estos son generalmente organismos unicelulares que ocasionalmente se reúnen en forma de grupos o  
25 aglomerados. Las células pueden ser usadas de esta forma, siempre que el tamaño de su aglomerado no sea tan grande que haga que el cuerpo superficial de soporte resultante sea inútil para el objeto particular para el que se pretende emplear.  
30



Si han de unirse enzimas a las células microbianas y han de emplearse en procedimientos químicos de conversión, generalmente no hay límite alguno en el tamaño del aglomerado. Sin embargo, cuando el reactivo proteínico ha de emplearse en un ensayo inmunológico del tipo de una aglutinación, el tamaño de los aglomerados de partículas no ha de ser tan grande que el reactivo no se aglutine en presencia de una sustancia inmunológica que es homóloga del material proteínico unido a las células aglomeradas.

Las células microbianas preferidas son células bacterianas, o aglomerados de las mismas, de forma y tamaño uniforme, y que tienen unas dimensiones exteriores máximas, en una dirección, de desde aproximadamente 0,2 a 10 micrones. Aunque no se prefiere, puede utilizarse una mezcla de células diferentes, pero uniformes. Para estas bacterias, las células microbianas utilizables comprenden las de la División I del Reino vegetal, incluyendo las Clases I, II y III, Orden I. Las células microbianas de la Clase III, Orden I incluyen las partículas intracelulares de virus que tienen dimensiones de aproximadamente 0,2 micrones.

Para conseguir una enumeración completa de las células bacterianas utilizables, puede consultarse el Manual of Determinative Bacteriology de Bergey, por R.S.

Breed. E.G.D. Murray, N. R. Smith, 7ª edición, 1947, Williams y Wilkins Company. Son particularmente útiles las bacterias de la Clase II, Suborden II, Familia IV (Seudomonadeceus) y de la Clase II, Orden IV, Familia IV (Enterobacteriáceas). Se considera que todas las razas o géneros I-V representan células microbianas preferidas para

30  
5.12.68.



los fines de esta invención. También se consideran preferidas las de la Clase II, Orden IV, Familias V (Bruceláceas), X (Lactobaciláceas) y XIII (Baciláceas). Si se desean partículas de tamaño inferior, de aproximadamente 0,2 micrones o menos, pueden emplearse tanto el Orden I como el II de los organismos de Clase III. Particularmente las virales de Orden II son de pequeña dimensión, lo que limita su utilidad.

Son células bacterianas especialmente preferidas las de Brucella abortus, Escherichia coli, Bacillus Subtilis, Bacillus pumilus, Lactobacillus leichmannii y Pseudomonas fragi. Las fases de desarrollo de levaduras de las células de hongos son preferidas también para su empleo en la invención. Es particularmente preferida la levadura disponible comúnmente, Saccharomyces cerevisiae.

Las células microbianas pueden emplearse en su estado natural, es decir el compuesto tetrazotado o el compuesto reticulado pueden ser hecho reaccionar con ellas, y después puede ser unido el material proteínico tal como se ha expuesto anteriormente. No obstante, si las características patógenas naturales de cualquiera de las células microbianas se consideran un peligro, la antigenicidad natural, y por tanto las características patógenas, pueden ser eliminadas tratando o exterminando las células microbianas con un agente protector. Los agentes protectores comunes más eficaces son el formaldehído y el fenol. Es observable que cuando las células microbianas han sido tratadas con un agente protector o antiséptico y además han sido alteradas después uniendo a ellas materiales proteínicos, los grupos antigénicos naturales de las superfi

30  
5.12.68.



cias de las células son modificados lo suficiente como para hacerlos inactivos.

5 Si se desea, las células microbianas u otras partículas portadoras pueden ser teñidas para mejorar la posibilidad de distinción visual del reactivo proteínico resultante con respecto al medio ambiente circundante. Para este objeto pueden ser utilizados los tintes ordinarios, tales como la hematoxilina, fucsina y el violeta de metilo. Otro tratamiento opcional es lavar las células  
10 con disolventes orgánicos tales como los alcoholes, éteres, etc., para separar cualquier capa de polisacárido o cera que pueda estar presente.

Las partículas insolubles revestidas con proteínas pueden ser formadas recubriendo partículas con una  
15 gama de tamaños de desde aproximadamente 0,1 a 10 micrones con un material proteínico tal como la gelatina, por una técnica tal como la coacervación o la encapsulación. Por ejemplo, pueden ser encapsuladas partículas de poliestireno, tal como se expone en la Patente de los EE.UU. Nº.  
20 3.234.096, de Pollack, poniéndolas en emulsión en una solución de gelatina, y secando después la emulsión por pulverización. Sólo es necesario que se deposite una delgada película de gelatina sobre las superficies de las partículas, de tal modo que el compuesto tetrazotado y el  
25 compuesto reticulado puedan ser hechos reaccionar con ella.

Todas las partículas portadoras anteriormente descritas tiene suficiente reactividad superficial para reaccionar, tanto con el compuesto tetrazotado como con el compuesto reticulado. No se requiere que las partículas  
30  
5.12.68.



utilizadas sean una de las expuestas anteriormente, ya que el único requerimiento es que las partículas utilizadas tengan la reactividad funcional indicada.

5 Para el material proteínico de la presente invención puede emplearse una amplia variedad de materiales inmunológicos. Los siguientes materiales inmunológicos son ejemplos de los que pueden utilizarse como materiales proteínicos según la presente invención: albúmina de suero bovino, albúmina de suero humano, ovoalbúmina, gonadotropina coriónica humana (GCH), antígenos de grupos sanguíneos A y B, gammaglobulinas, betaglobulinas, beta-lioproteína y alfa globulinas de las fracciones de plasma humano, proteína reactiva anti-C derivada de la cabra o la oveja, antitoxina de la difteria, antitoxina del tétanos, transferrina humana, antígeno de trichinella, tiroglobulina y materiales antigénicos similares de organismos naturales o patógenos, mioglobina, hemoglobina, hormona luteínica, e insulina. Como materiales proteínicos para formar un reactivo según la presente invención pueden utilizarse, si se desea, los contrarios inmunológicos de estos materiales. Estos materiales de acción opuesta son o bien un antígeno o un anticuerpo que reacciona especialmente con el anticuerpo o antígeno correspondiente.

10

15

20

Una ventaja del procedimiento para producir un reactivo proteínico según la presente invención es que los antígenos que son ordinariamente insolubles en el medio líquido usado para llevar a cabo los procedimientos de unión de una sola fase pueden ser empleados ahora en una forma unida, por el hecho de que su insolubilidad puede ser evitada por ajuste del pH del medio líquido empleado para el

25

30

5.12.68.



procedimiento de la presente invención. Así, la mioglobina que es insoluble a pH 7 bajo las condiciones usuales de unión para la bis-diazobencidina, puede ser unida, según el procedimiento de la presente invención, empleando un medio líquido con un pH de desde 9 a 10, y llevando a cabo el tratamiento de la misma con uno de los compuestos reticulados tales como la azida de ácido pirrol carboxílico o la azida de ácido tiofencarboxílico.

El material proteínico unido a las partículas portadoras puede ser una enzima tal como la diastasa, maltasa, zimasa, amilasa, u otras enzimas y/o co-enzimas. Cuando una enzima se une a una partícula portadora, puede ser empleada para efectuar los procedimientos de conversión enzimática de una manera preferida. Así, las tres primeras enzimas antes indicadas pueden ser empleadas en un procedimiento en tres fases para la conversión de almidón en alcohol, mientras que la última enzima enumerada puede ser empleada para convertir suspensiones de almidón en jarabes de azúcar. Una ventaja de emplear las enzimas en forma insolubilizada uniéndolas a partículas portadoras sólidas, según la presente invención, es que las enzimas no llegan a entremezclarse con el material a ser tratado si las partículas son retenidas en una posición fija o atrapadas en un lecho a través del cual puede pasar el material que está siendo convertido. Como otro ejemplo de un procedimiento de conversión enzimática, las melazas residuales pueden ser convertidas en alcohol uniendo tanto invertasa como zimasa a partículas de soporte, y haciendo pasar después las melazas sobre las mismas.

30  
5.12.68.

Otra ventaja es que el compuesto tetrazotado



o el compuesto reticulado pueden ser elegidos de tal modo que reaccionen con grupos diferentes del material proteínico según la utilidad final del reactivo proteínico formado. Así, el compuesto tetrazotado o el compuesto reticulado empleados para unirse al material de antígeno o de anticuerpo puede ser elegido de modo que se una de la manera más ventajosa, es decir, de una manera que evita la unión próxima a los puntos antigénicos que participan en la reacción antígeno-anticuerpo para esa reacción inmunológica particular. Esta capacidad permite que los anticuerpos o antígenos sean unidos de varios modos diferentes a las mismas partículas portadoras, con el fin de exponer todos los puntos antigénicos disponibles, y esto es importante, pues es sabido que animales diferentes forman anticuerpos para diferentes partes de moléculas antigénicas.

#### DESCRIPCION DE LA REALIZACION PREFERIDA

Generalmente se prefiere tratar el material proteínico con el compuesto reticulado de la presente invención, unir el compuesto tetrazotado a las partículas de soporte, y después hacer reaccionar estos dos materiales tratados para formar el reactivo proteínico. Un ejemplo específico de este procedimiento preferido es el tratamiento de mioglobina con azida de ácido pirrol-2-carboxílico cuando se disuelve en dioxano y agua. Simultáneamente, pueden hacerse reaccionar glóbulos rojos formalinizados, obtenidos de una oveja, con bis-diazobencidina disuelta en un medio acuoso tamponado con acetato. La mioglobina tratada puede ser purificada por diálisis y después ser hecha reaccionar con los glóbulos rojos unidos,

30  
5.12.68.



para formar el indicador proteínico final.

Este indicador puede ser utilizado después en la inhibición de ensayos de aglutinación para detectar mioglobina en muestras de suero, siguiendo los procedimientos generales de ensayos inmunológicos para la inhibición de las valoraciones de aglutinación expuestos en la Patente de los EE.UU. No. 3.236.732.

Los anteriores ejemplos y la descripción general se detallan además en los ejemplos siguientes, que han de ser considerados sólo como ilustrativos, y no limitativos, de la invención. Las concentraciones se expresan en forma de normalidades (N) y molaridades (M).

#### EJEMPLO I

En este ejemplo se expone un método para producir un reactivo proteínico, en el que se emplean glóbulos rojos (eritrocitos) como partículas de soporte, y mioglobina como material proteínico. El reactivo resultante puede ser empleado para detectar la mioglobina antigénica, empleando un procedimiento de ensayo de inhibición de la aglutinación en el que el reactivo es empleado conjuntamente con el anticuerpo para la mioglobina.

Venticuatro (24) mg. de mioglobina cruda fueron disueltos en 10 ml. de tampón de fosfato 0,15 M, de pH 7,4, y se añaden 100 mg. de bicarbonato de sodio. El pH fue ajustado después a 9-10 con hidróxido de sodio 0,1 N. Después, 100 mg. de azida de ácido pirrol-2-carboxílico fueron disueltos en 4 ml. de una mezcla de volúmenes iguales de dioxano y agua. La disolución de azida de pirrol fue añadida después gota a gota a la disolución de mioglobina, con agitación. Durante esta adición, el pH fue

30  
5.12.68.



mantenido entre 9 y 10 por adición de hidróxido de sodio 0,1 N. Una vez completada la adición de azida de pirrol, la mezcla de reacción fue dializada durante aproximadamente setenta y dos (72) horas frente a 2 l. (litros) de disolución salina tamponada con fosfato, de pH 7, con dos cambios por día. La disolución de sal tamponada con fosfato empleada fue preparada añadiendo 22,7 ml. de  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$  0,5 M y 1,6 ml. de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$  4 M a suficiente disolución salina isotónica para completar 2 litros. La mioglobina así tratada constaba de moléculas de mioglobina unidas químicamente al compuesto reticulado, según la anterior ecuación (2) de reacción.

Las partículas de soporte fueron unidas al compuesto tetrazotado según el procedimiento siguiente. Siete (7) ml. de una suspensión al 10% de glóbulos rojos de oveja formalinizados, fueron centrifugados y puestos de nuevo en suspensión en 8 ml. de tampón de acetato preparado añadiendo 20 ml. de acetato de sodio 2 M y 33,7 ml. de ácido acético 3,5 M a suficiente disolución salina isotónica para completar 2 l., y ajustando a pH 3,5 con ácido acético glacial. Después de la adición de los glóbulos rojos a la disolución tamponadora, el pH de la suspensión fue ajustado a 3-4 con el ácido acético glacial según se necesita.

Fue preparado un compuesto tetrazotado, bis-diazobencidina (BDB) según el siguiente procedimiento. A 10 ml. de agua destilada se añadieron 0,680 g. de nitrito de sodio,  $\text{NO}_2\text{Na}$ . Esta disolución, en su recipiente, fue sumergida después en un baño de hielo y enfriada a menos de 4°C antes de su empleo. A continuación fueron disueltos

5.12.68.



0,640 g. de clorhidrato de bencidina en 100 ml. de ClH di-  
 luído (15 ml. de ClH concentrado por l.). Esta segunda di-  
 solución, en su recipiente, fue colocada en un baño de  
 hielo y agitada hasta que la disolución llegó a 4°C. Des-  
 pués fue extraída con una pipeta una porción de 5 ml. de  
 la disolución anterior de NO<sub>2</sub>Na, y fue añadida gota a go-  
 ta a la disolución de bencidina, uniformemente, y con agi-  
 tación, durante un período de 7 a 10 minutos. Después de  
 20 minutos más de agitación, la disolución estaba prepara-  
 da para su empleo inmediato.

Después, 2 ml. de la disolución de BDB fueron  
 diluídos con 1 ml. del tampón de acetato de pH 3,5, y ade-  
 más con 1 ml. de agua. La disolución resultante de BDB  
 fue añadida gota a gota a la suspensión de glóbulos rojos  
 preparada anteriormente. Después fue ajustado el pH a 3-4,  
 y la mezcla fue agitada después lentamente a temperatura  
 ambiente durante 30 minutos. Después de esto, los glóbu-  
 los fueron centrifugados y lavados 3 veces con el tampón  
 de acetato de pH 3,5, y después puestos de nuevo en suspen-  
 sión en 8 ml. de disolución salina isotónica. La suspen-  
 sión resultante contenía los glóbulos rojos unidos al com-  
 puesto tetrazotado, BDB, y corresponde por tanto a la fór-  
 mula estructural mostrada al final de la ecuación (1) de  
 reacción anterior.

El reactivo proteínico final fue preparado aña-  
 diendo lentamente el material dializado de mioglobina-pi-  
 rrol a la suspensión de glóbulos rojos, con agitación. El  
 pH fue ajustado a 6-7 con hidróxido de sodio, y la mezcla  
 fue hecha girar durante 4 a 8 horas a temperatura ambiente  
 (25°C), después de lo cual fue almacenada en un recipiente

5.12.68.



refrigerado. Para su empleo, el conjugado resultante fue lavado 4 veces con disolución salina isotónica y puesto de nuevo en suspensión en 40 ml. de disolución salina, o de sal común. Este reactivo proteínico puede ser empleado  
5 por ejemplo en un ensayo inmunológico, en el que puede detectarse la mioglobina empleando un procedimiento de ensayo de inhibición de la aglutinación.

Este reactivo proteínico final muestra una coloración roja típica, lo que indica que el resto de unión del BDB sobre los glóbulos rojos se unió con el núcleo aromático del compuesto reticulador unido a la mioglobina, en lugar de unirse directamente a la estructura de la mioglobina, en cuyo caso la misma concentración de reactivo hubiera tenido un aspecto parduzco.

15

#### EJEMPLO II

Fueron preparados varios reactivos proteínicos según el procedimiento del anterior Ejemplo I. Se sustituyeron el compuesto tetrazotado, el compuesto reticulador y el material proteínico unido a los glóbulos rojos.  
20 Los reactivos fueron preparados empleando el material que se expone en la tabla siguiente en lugar de los empleados en el Ejemplo I:

5.12.68.

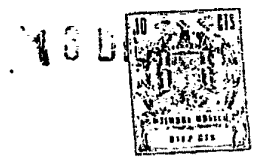


TABLA 1

COMPOSICION DE LOS REACTIVOS ADICIONALES

	<u>Reactivos</u>			
	<u>Compues- to tetra</u>	<u>Compuesto reticulado</u>	<u>Material proteini- co</u>	
5				
	A	BDB	Azida de ácido tiofen- 2-carboxílico	mioglobina
	B	"	Igual que en el Ej. 1	gonadotropina cori- ónica
	C	"	"	hemoglobina
10	D	"	Azida de ácido tiofen- 2-carboxílico	"
	E	bis-diazo dianisidi- na	Igual que en el Ej. 1	"
	F	"	Azida de ácido tiofen- 2-carboxílico	"
15	G	"	Igual que en el Ej. 1	gonadotropina co- riónica.
	H	"	"	hemoglobina
	I	"	Azida de ácido tiofen- 2-carboxílico	"

En la preparación de los reactivos de acuerdo con la Tabla anterior, siguiendo el procedimiento del Ejem-  
 plo I, todos los reactivos sustituidos fueron manejados de la misma manera que los reactivos de ese ejemplo, con la excepción de la gonadotropina coriónica, que fue empleada de la manera que se explica a continuación. Cinco (5) mg. de gonadotropina coriónica humana, obtenida de la Vitame-  
 rican Company, que tenía una potencia de 2000-3000 U.I. por mg., fueron disueltos en una disolución tampón de fos-  
 fato 0,15 M de pH 7,4, a la que habían sido añadidos 100 mg. de bicarbonato de sodio. Esta disolución fue empleada en lugar del material de mioglobina del Ejemplo I.

30  
5.12.68.



Los reactivos proteínicos preparados anteriormente fueron empleados después como reactivos de ensayo inmunológico, de la forma expuesta en la sección de procedimiento de ensayo de la Patente de los EE.UU. No.

5 3.236.732, según las siguientes operaciones específicas. Fue preparada una serie de vasos de ensayo y de control colocando en ellos una cantidad apropiada de disolución salina tamponada con veronal del antisuero preparado contra cada uno de los antígenos específicos (materiales proteínicos) de los reactivos de ensayo. A cada uno de los  
10 vasos fue añadida una gota de una muestra biológica que contenía los antígenos. Por cada vaso de ensayo fue preparado un vaso de control añadiendo 1 gota de una disolución salina fisiológica en lugar de la muestra. Los controles  
15 para las disoluciones de antisuero eran albúmina de suero normal de conejo o de suero bovino. A cada uno de estos vasos preparados de ensayo y de control se añadió 1 gota del reactivo A-I antes preparado, y fueron observadas las configuraciones formadas por estos reactivos durante el  
20 período de desde aproximadamente 30 minutos desde la última adición hasta aproximadamente 2 horas desde la última adición. Cuando la muestra sometida a ensayo contenía el antígeno mostrado en la Tabla I en un estado no ligado, se observaba un anillo o mancha de glóbulos en el fondo  
25 de los vasos de ensayo, y cuando la muestra de ensayo no contenía el antígeno aparecía en los vasos una configuración aglutinada. Así, en el primer caso en el que la muestra contenía el antígeno libre, se dice que el indicador precipita.

30  
5.12.68.

De los datos de los ensayos anteriores se de-



terminaron las diluciones apropiadas para cada uno de los indicadores, y después estas disoluciones fueron preparadas en una disolución de peptona al 2% (2 g. de peptona en una disolución salina tamponada con veronal) refrigerada.

5

Los reactivos preparados para ensayos inmunológicos fueron centrifugados y puestos en suspensión en albúmina de suero bovino al 1% en disolución salina tamponada con veronal. Enseguida, las disoluciones en peptona preparadas de los antisueros fueron añadidas a una zona de reacción de cada una de una serie de cápsulas de reacción, teniendo cada una de ellas 2 zonas que contienen reactivos, y se colocó 1 gota de la suspensión de reactivo de ensayo en la otra zona de reacción de cada una de dichas cápsulas. Estas cápsulas fueron colocadas después sobre gradillas de aluminio y enfriadas a  $-40^{\circ}\text{C}$  en un liofilizador comercial estándar. Después de un período apropiado de tiempo en el que el agua fue separada de las cápsulas, se retiraron del liofilizador y se introdujeron en una zona de baja humedad y parcialmente cerrada, y se envasaron con paquetes desecantes.

10

15

20

Habiendo establecido previamente las diluciones adecuadas de los antisueros y los reactivos de ensayo liofilizados, se dispone de una forma comercial que puede ser envasada para su empleo final en la realización de ensayos inmunológicos.

25

Este ejemplo demuestra que pueden prepararse varios reactivos proteínicos diferentes según la presente invención, y que éstos pueden ser empleados después para producir sistemas envasados de ensayos inmunológicos, co-

30  
5.12.68.



mercialmente deseables, que pueden ser almacenados y transportados en estado seco.

### EJEMPLO III

5           Fueron preparados los reactivos inmunológicos del Ejemplo I, y los A, C y D del Ejemplo II, sustituyendo los glóbulos rojos de estos ejemplos por células bacterianas. Las células bacterianas empleadas como miembros superficiales de soporte para los antígenos eran Escherichia coli, que fueron obtenidos cultivando un residuo intestinal procedente de un conejo de laboratorio muerto en un caldo de infusión de cerebro-corazón (ICC). Se utilizó un volumen de 68 ml. de un cultivo de buen desarrollo (18 horas) para inocular 3 l. de ICC cuya esterilidad había sido comprobada previamente. Las células fueron incubadas  
10 después durante 4,5 horas a 37°C, con agitación. Se comprobó que las células resultantes eran de tamaño y forma uniformes. Estas células fueron formalinizadas por tratamiento con una disolución de aproximadamente 37% de formaldehído tratado con carbonato de calcio. Después, estas células fueron empleadas de la misma manera que la explicada para los glóbulos rojos de los anteriores Ejemplos I y II.

15           A causa del menor tamaño de los reactivos proteínicos preparados según este ejemplo, las células bacterianas pudieron emplearse para ensayos de aglutinación en porta-objetos. En este ensayo, 1 gota de los reactivos constituidos como se ha expuesto anteriormente fue mezclada, sobre un porta-objetos de vidrio, con 1 gota de una dilución de los antisueros apropiados y 1 gota de la muestra de ensayo. La ausencia de configuraciones de aglutinación indica la presencia del antígeno que se está determi-

30  
5.12.68.



nando en la muestra de ensayo.

#### EJEMPLO IV

5 Se formó un reactivo proteínico que constaba de glóbulos rojos unidos a albúmina de suero bovino (ASB), empleando como compuesto tetrazotado bis-diazobencidina y como compuesto reticulador ácido 2-furoico, y empleando como activador de ácido el N-etil-5-fenilsoxazolio-3'-sul-

10 fonato, conocido como reactivo K de Woodward. Doscientos venticuatro (224) mg. de ácido 2-furoico fueron disueltos en 10 ml. de disolución 0,1 N de NaOH, y después se hicieron reaccionar durante 30 minutos con 506 mg. de reactivo K de Woodward. A esta disolución se añadieron después 25 mg. de ASB en 10 ml. de agua, y se dejó transcurrir la reacción durante 2 horas a temperatura ambiente (25°C), antes de la diálisis a 4°C durante 15 tres días. El volumen final del material proteínico tratado fue ajustado a 25 ml., y se utilizaron 5 ml. como 5 mg. de proteína, según la descripción siguiente.

20 Fueron centrifugados glóbulos rojos de oveja formalinizados, se desechó el líquido que sobrenadaba, y los glóbulos fueron puestos de nuevo en suspensión en 17 ml. de tampón de acetato (pH 4,0). Se les añadió 1 ml. de BDB preparada como en el Ejemplo I, diluída en 5 ml. de tampón de acetato, y la mezcla fue agitada durante 30 minutos. El producto unido resultante fue lavado después 3 25 veces en disolución de sal y 3 ml. de una suspensión al 10%, y después fue diluída hasta un volumen total de 17 ml.

30 El producto de ASB-furano y el tampón de fosfato preparados como en el Ejemplo I anterior fueron añadidos.  
5.12.68.



dos, en volúmenes iguales de 5 ml. de cada uno de ellos,  
a los 17 ml. de los glóbulos de oveja unidos a BDB, y se  
hicieron girar a temperatura ambiente durante aproximada-  
mente 4 horas, después de las cuales fue guardado a 4°C  
5 durante toda la noche. El reactivo resultante fue lavado  
después 4 veces con disolución salina y valorado frente a  
2 diluciones diferentes de sueros anti-ASB. Ambas valoraciones  
demostraron que el reactivo era inhibido por completo por una  
disolución de ASB al 0,1%.

10

#### EJEMPLO V

En el reactivo del Ejemplo se efectuaron tres variaciones específicas, como sigue:

La BDB fue sustituida por el mismo volumen de una disolución que contenía 18 mg. de la sal doble de cloruro de cinz de bis-(4)-diazonio fenilamina disuelta en  
15 ml. de agua destilada, en una de las variaciones.

La variación siguiente consistió en disolver 20 mg. de gamma globulina bovina en disolución salina, y tratarlos con 100 microlitros de cloruro de 2-tiofenosulfonilo, con agitación posterior durante aproximadamente  
20 17 horas. Al cabo de este tiempo, el material proteínico tratado fue dializado durante tres días, con cambios frecuentes de agua destilada. Después fue hecho reaccionar con los glóbulos rojos unidos a la BDB, como en el anterior ejemplo.  
25

La tercera variación fue similar a la segunda, con la única excepción de que se emplearon 10 microlitros del compuesto reticulador, cloruro de 2-tiofenosulfonilo.

#### EJEMPLO VI

30  
5.12.68.

Fue producido, según la presente invención,



un reactivo proteínico capaz de determinar concentraciones de insulina o de anticuerpo de insulina en suero, como sigue:

5 Cincuenta (50) mg. de insulina fueron mezclados con 10 ml. de agua destilada y suficiente ClH 0,1 N para disolver toda la insulina, y después con 10 ml. de tampón de borato, con un pH de 9,0. A esta disolución fueron añadidos lentamente 500 mg. de azida de ácido pirrol-2-carboxílico disuelta en volúmenes iguales de dioxano y  
10 agua (8 ml. en total). El pH fue mantenido en 9-10 con NaOH 0,1 N. Una vez completado el tratamiento de la insulina, fue añadida la disolución de NaOH para aumentar el pH a 9,8. Después, esta suspensión fue filtrada, dializada frente a agua destilada, y después liofilizada según el  
15 procedimiento explicado en el anterior Ejemplo II.

Tres ml. de glóbulos rojos de oveja formalinizados al 10% fueron centrifugados, y se desechó el líquido que sobrenadaba. Los glóbulos fueron puestos de nuevo en suspensión en 8,0 ml. de tampón de acetato que tenía un  
20 pH de 3,5, y tratados con 1,0 ml. de bis-diazobencidina disuelta en 1,0 ml. de tampón y 1,0 ml. de agua destilada. La suspensión resultante fue agitada durante 30 minutos, y después los glóbulos fueron lavados cuatro veces con el tampón de acetato anterior. Los glóbulos fueron puestos  
25 de nuevo en suspensión en 10 ml. del tampón de acetato.

Una disolución de 5 mg. de la insulina tratada con la azida de ácido de pirrol fue disuelta en 10 ml. de una disolución tamponadora de fosfato de sodio que tenía un pH de 7,4, y añadida a glóbulos rojos de oveja unidos a BDB, para formar el reactivo final. Se añadieron 10  
30  
5.12.68.



ml. más de la disolución tampón, y el pH fue ajustado a 8,0. La mezcla resultante fue agitada durante 4 horas, y se dejó reposar durante aproximadamente 17 horas. Los glóbulos fueron lavados después 4 veces con aproximadamente 25 ml. de disolución salina tamponada con veronal, y puestos de nuevo en suspensión en 18 ml. de disolución de sal tamponada con veronal.

En resumen, pueden ser producidos, según la presente invención, un gran número y variedad de reactivos proteínicos. Estos pueden ser preparados a partir de una amplia variedad de partículas de soporte y de materiales proteínicos, empleando cualquiera de los compuestos tetrazotados y compuestos reticulados reivindicados para el método en tres fases descrito.

La presente solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América, el 1 de Noviembre de 1.967, bajo el número 679.628, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

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:

1.- Un procedimiento para producir un reactivo

24  
5.12.68.



proteínico, caracterizado por las operaciones de tratar un material proteínico con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un compuesto aromático tetrazotado y un compuesto reticulador que tiene un resto aromático que es más susceptible de sustitución electrofílica que cualquier resto aromático proteínico presente, unir el compuesto restante de dicho grupo a una partícula de vehículo proteínico que tiene suficiente reactividad como para reaccionar con dicho compuesto restante, y a continuación hacer reaccionar el material proteínico tratado con la partícula portadora unida para formar dicho reactivo proteínico.

2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas operaciones de tratamiento, unión y reacción son realizadas en medio líquido y en el que dicho reactivo proteínico es, a continuación, recuperado en forma seca.

3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha partícula portadora proteínica es seleccionada del grupo que consiste en glóbulos rojos, células microbianas, y partículas insolubles revestidas con proteínas.

4.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho material proteínico es seleccionado del grupo que consiste en un antígeno, un anticuerpo y una enzima.

5.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho material proteínico es tratado con un compuesto reticulador y en el que dicho compuesto tetrazotado está unido a dicha partícula vehículo.

30  
5.12.68.



6.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto tetrazotado es seleccionado del grupo que consiste en bis-diazobenzidina, bis-diazodiazonidina, y 4,4'-difenilamina tetrazotada.

5 7.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto reticulador es seleccionado del grupo que consiste en azida de ácido pirrol-2-carbocíclico, azida de ácido tiofen-2-carbocíclico, cloruro de 2-tiofensulfonilo y ácido 2-furoico.

10 8.- Un procedimiento para producir un reactivo proteínico.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y para los fines que se han especificado.

15 Esta Memoria consta de veintinueve hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

P. A.

G.D.S.  
5.12.68.