

377661

28



P.- 44.143

OA/5623-724

Memoria descriptiva

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE <u>G 01</u>
SUBCLASE <u>N</u>

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de N.V. ORGANON

entidad / ~~de nacionalidad~~ holandesa

con domicilio en Kloosterstraat 6, Oss, Holanda

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA COMPOSICION DE REACTIVO DE ENSAYO ANALITICO, INMUNOLOGICO O DE DIAGNOSTICO"

(Clase Internacional COLn)



La presente invención se refiere a nuevos reactivos granulados, a métodos de ensayo y a aparatos para efectuar, in vitro, reacciones analíticas e inmunológicas, y en especial ensayos de diagnóstico con ellos.

5 Los ensayos analíticos e inmunológicos con los que está relacionada la presente Invención son, lo más corrientemente, ensayos de laboratorio que tienen por objeto la determinación de la presencia o ausencia de antígenos o anticuerpos o enzimas en fluidos corporales, como ayuda en la diagnosis de ciertos estados fisiológicos o patológicos, en el hombre y en animales, Según la especial combinación de reactivos y líquido de ensayo empleada, la reacción puede dar lugar a la formación de un precipitado, en cuyo caso se la conoce como reacción de precipitación. Cuando la reacción tiene lugar entre sustancias distribuidas en un medio líquido, una de cuyas sustancias, por lo menos, es un sólido que llega a aglomerarse, la reacción se conoce como reacción de aglutinación. La formación del precipitado o la aglutinación, o la inhibición de aglutinación de partículas especialmente tratadas, se manifiesta visualmente en la manera en que el precipitado se forma o se distribuyen las partículas, siguiendo la reacción.

15 Los ensayos inmunológicos, que pueden incluir, por ejemplo, ensayos de determinación del grupo sanguíneo, embarazo y fenómenos similares, se efectúan habitualmente con reactivos tales como, por ejemplo, una suspensión de eritrocitos sensibilizados y una solución de un antisuero adecuado, dispensada a un vial de ensayo desde un cuentagotas. Aun cuando la suspensión de eritrocitos puede haber



sido titulada muy cuidadosamente, el empleo de viales y
cuentagotas no solamente es caro, sino que es probable
que proporcione resultados dudosos debido a las limita-
ciones en la exactitud de los cuentagotas ordinarios. -
5 Tales cuentagotas están sin calibrar, corrientemente, y
aunque la exactitud del tamaño de la gota es de gran im-
portancia, tal exactitud raramente se alcanza y el tama-
ño de las gotas es variable e informal.

En vista de las deficiencias que tienen los -
10 métodos de ensayo vial-cuentagotas, se ha propuesto en
la técnica anterior, efectuar las reacciones de aglutina-
ción depositando una gota, exactamente medida, de un -
reactivo sobre un porta o una superficie soporte de car-
tulina, y dejar que se seque la gota, después de lo cual
15 puede depositarse seguidamente el líquido de ensayo so-
bre ello para observar los resultados. Los métodos de -
este tipo también están sometidos a inexactitudes en la
aplicación de los reactivos, así como a las observacio-
nes efectuadas.

También es necesario, con frecuencia, para --
20 reactivos inmunológicos, tales como eritrocitos sensibi-
lizados, o materias protéicas sensibles, preservarles -
mediante refrigeración. Esto lleva consigo, necesariamen-
te, la presencia de un equipo de refrigeración especial
25 y ello consume espacio y también tiempo, debido al proble-
ma de la transferencia de soluciones refrigeradas. Se -
han llevado a cabo trabajos para superar las limitaciones
inherentes a los métodos de ensayo vial-cuentagotas y a
los métodos tipo portaobjetos, sometiendo los reactivos,
30 -que pueden ser incompatibles unos con otros, en presen-



5 cia de humedad,- a congelación en capas sucesivas en un
 recipiente y después de ello liofilizando los estratos-
 congelados y en la Patente de EE.UU. 3.269.905 se descri-
 be un método de este tipo. Sin embargo, tal procedimiento
 requiere aparatos especiales y conocimientos técnicos y
 es caro y se consume tiempo para llevarle a cabo.

10 Uno de los principales objetos de la presente -
 invención, es una composición de reactivo analítico, que
 se caracteriza por comprender un gránulo sólido, estable,
 que contiene una cantidad previamente determinada de un
 reactivo de ensayo, habiendo sido formado dicho gránulo -
 mediante congelación y después liofilización, de gotas de
 una solución o suspensión acuosa de dicho reactivo.

15 Conforme a otro aspecto de la presente Invención,
 se proporcionan nuevos reactivos analíticos, de diagnósti-
 co e inmunológicos, granulados, estables, sólidos, secos,
 en forma de perlas o pequeñas esferas, proporcionando cada
 uno una cantidad de reactivo previamente determinada y -
 exactamente medida. Aún cuando los reactivos, a partir de
 20 los que se preparan los gránulos, son sustancias reactivas
 y pueden ser mutuamente incompatibles, los propios gránu-
 los tienen la ventaja de que son estables y pueden encon-
 trarse presentes, juntos, en un recipiente común, durante
 un periodo de tiempo indefinido, sin interacción. Sin em-
 25 bargo, los reactivos existentes en los gránulos se recons-
 tituyen fácilmente y pueden estar listos para un ensayo -
 analítico, inmunológico o de diagnóstico, mediante la sim-
 ple adición a los mismos del líquido a ensayar.

30 La composición, preparación y empleo de los reac-
 tivos granulados de la Invención, se ilustrará, específi-

11-4-70

377661



camente, con respecto a reactivos para un ensayo inmunológico o de diagnóstico, para detectar la presencia de gonadotropina coriónica humana (HCG) en orina, cuyo ensayo se utiliza para el diagnóstico del embarazo.

5 Sin embargo, puede comprenderse fácilmente por los expertos en la materia, que los principios de la Invención no han de considerarse como limitados a ello, si no que también pueden extenderse a la preparación y empleo de una extensa gama de reactivos analíticos, inmunológicos y de diagnóstico, y a una amplia variedad de ensayos que pueden emplear uno o una multiplicidad de diferentes reactivos granulados. Además, pueden granularse, 10 asimismo, según la Invención sustancias auxiliares, tales como tampones, y pueden utilizarse en forma seca, estable, 15 en unión de uno o más gránulos de reactivo de ensayos diagnósticos.

El procedimiento de preparación de los reactivos granulados de la Invención, comprende, ampliamente, las etapas de:

- 20 (a) Formar una solución o suspensión acuosa del reactivo que tiene una concentración previamente determinada;
- (b) Formar una gota de dicha solución o suspensión, que cae en caída libre, exactamente medida o calibrada;
- 25 (c) Dejar caer dicha gota a través de una masa de un líquido, inmiscible con agua, que tiene una densidad inferior a la del agua y que posee un gradiente de temperatura que varía desde la temperatura ambiente, aproximadamente, en su superficie más alta, hasta, a lo sumo, una temperatura por debajo del punto de congelación de la solución que se está conge-
- 30



lando con ello dichas gotas obteniéndose gránulos o perlas congeladas;

- (d) Recoger los gránulos congelados que contienen una cantidad previamente determinada del reactivo, en el fondo de dicha masa de líquido; y
- (e) Liofilizar los gránulos congelados recogidos.

El método de preparación de los gránulos de la Invención se comprenderá con mayor claridad haciendo referencia a los dibujos que se acompañan, en los que la Figura 1 representa, en forma esquemática, un sistema para la formación de gotas de reactivo y su congelación hasta gránulos sólidos estables.

Con referencia a la Figura 1, se prepara en primer lugar una solución o suspensión acuosa que contiene una concentración conocida del reactivo. Se incorpora, ventajosamente, en la solución o suspensión, una cantidad adecuada de una sustancia que produce una matriz inerte, o agente de masa, que ayuda para dar cuerpo al gránulo liofilizado.

Como ejemplos de agentes de masa adecuados se incluyen azúcares, tales como sacarosa, manosa, lactosa y manita, sustancias proteicas como las proteínas séricas, hidrolizados de lactoalbúmina e hidrolizados de caseína.

La solución o suspensión de reactivo, se bombea desde su recipiente de almacenamiento, 1, a través de un conducto flexible, 2, que puede estar hecho de plástico, por ejemplo, tubo de polietileno transparente, por medio de una bomba de dosificación, 3. Esta es, preferentemente, una bomba de tipo pulsante que comprime la tubería flexi-



ble por medio de rodillos, con lo que mide una cantidad de solución, previamente determinada, por unidad de tiempo. Para formas gotas exactas, se utiliza una bomba que libera unos 2,0 ml. por minuto. Desde la bomba 3 la solución fluye a través de un supresor de pulsación, 4, para que se mantenga un flujo casi uniforme. Desde allí la solución pasa a un tipo especial de pipeta cuentagotas, 5, que descarga una cantidad exactamente medida, previamente determinada, en forma de gotas. Tales gotas pueden con- tener, por ejemplo, desde unos 0,025 hasta unos 0,07 ml. Para soluciones antisépticas y antigénicas de HCG, se escoge, precisamente, 0,05 ml, dado que ésto proporciona gránulos congelados de tamaño adecuado para los propósitos del ensayo.

La pipeta 5 está colocada a una altura adecuada sobre la superficie de una masa de un líquido inmiscible con agua, 6, que se mantiene en un recipiente, 7, y en el que la gota es congelada. La pipeta está colocada a una altura tal, por encima del nivel del líquido inmiscible con agua, que se evita el que salpique, a la vez que la altura permite una caída libre de la gota, lo que dá como resultado, gotas de tamaño apropiado y la formación de cuerpos verdaderamente esféricos, o bien antes o después de entrar en el líquido inmiscible con agua. Al objeto de mantener la altura desde la que cae la gota, para evitar la distorsión de la gota y el salpicado, se coloca un tubo de succión, 8, a un nivel apropiado. A medida que el hexano es desplazado por el volumen acuoso, introducido en forma de gotas, esta tubería de succión extrae el exceso de hexano y mantiene, con ello, un nivel constante.



El líquido inmiscible con agua, utilizado para la congelación puede ser un hidrocarburo líquido o un hidrocarburo halogenado líquido, o sus mezclas. Ejemplos de líquidos adecuados incluyen hexano, disulfuro de carbono, cloroformo, heptano, iso-octano, o tolueno, así como mezclas tales como hexano-cloroformo o benceno-hexano. Estas mezclas están ideadas de manera que siempre tengan una densidad menor que la del agua. Por ejemplo, el hexano tiene un peso específico de 0,6593 a 20°/4°C. El peso específico puede ajustarse a cualquier nivel deseado, mezclando con el hexano otro líquido, tal como el tetracloruro de carbono, al objeto de mantener una velocidad controlada de caída de la gota. La velocidad de caída es, ventajosamente, del orden de unos 15 cm. por segundo, según sea la longitud de la columna de líquido. Cuanto más larga sea la columna, más rápida será la velocidad de caída que puede ser mantenida.

La masa de líquido de congelación se mantiene con un gradiente de temperatura que oscila desde la temperatura ambiente en su superficie más alta y que disminuye en dirección al fondo del líquido de tal manera que la temperatura desciende a unos -70°C en la parte del fondo. Ventajosamente el líquido se mantiene durante una corta distancia, por debajo de su superficie más alta a una temperatura comprendida entre 0° y 20°C. Por debajo de este nivel el enfriamiento del líquido se dispone de tal manera que la temperatura desciende a -70°C en la parte del fondo. Sin embargo, puede utilizarse cualquier temperatura inferior a esta cifra, según sea la naturaleza del líquido y el reactivo tratado. Por ejemplo, líqui-



dos criogénicos tales como el nitrógeno líquido que tiene un punto de ebullición de -143°C , u oxígeno líquido que tiene un punto de ebullición de -183°C , pueden utilizarse también.

5 La temperatura deseada de la columna líquida, se consigue o bien utilizando una mezcla frigorífica que rodea a la masa de líquido o mediante refrigeración mecánica a temperaturas equivalentes. Por ejemplo, la mezcla frigorífica puede ser una combinación de hielo seco y acetona, o de hielo seco y metil celosolve (éster monometílico del dietilenglicol).

10

Ventajosamente el nivel más alto de la porción refrigerada del líquido, que se mantiene entre unos 0°C y 20°C , comprende una zona que se extiende no más de unos 15 cm por debajo de la superficie del líquido. Esto proporciona una caída de 15 cm. a una temperatura por encima de la congelación y crea así una oportunidad para la formación de gránulos verdaderamente esféricos.

15

De esta forma se forman gotas esféricas que congelan en gránulos y descienden a través de la columna líquida. Los gránulos congelados se recogen en el fondo y pueden ser sacados y liofilizados, produciendo esferas secas estables, que contienen cantidades exactamente medidas de los reactivos deseados. Las esferas congeladas se recogen, preferentemente, en un cestillo de malla de alambre, y pueden manipularse mecánicamente, con facilidad, de manera que pueden colocarse en cualquier recipiente, previamente enfriado, como un tubo de ensayo, y liofilizarse in situ. Ventajosamente las esferas congeladas se almacenan bajo refrigeración, a temperaturas de -50°C

20

25

30



o inferiores, para evitar el crecimiento de cristales -
dentro de las esferas, que podría hacerlas quebradizas.

5 Para los propósitos de liofilización, una o -
más esferas de los reactivos seleccionados, se colocan -
en un recipiente previamente enfriado y se transfieren,
sin calentar, a los pisos de un aparato de liofilización
convencional, en los que tiene lugar la desecación, por
ejemplo, a una temperatura al comienzo de -50°C y que -
va ascendiendo durante la desecación hasta $+37^{\circ}\text{C}$, al fi-
10 nal, y a una presión al comienzo, no superior a unas --
 100μ y que se acerca a 5μ al final, que ocurre entre
18 horas y 24 horas más tarde.

15 Cuando los gránulos de reactivo se colocan en
un tubo de ensayo adecuado para su empleo futuro, el tu-
bo de ensayo puede, después, ser tapado utilizando un ϕ
cierre impermeable a la humedad y almacenado durante tiem-
po indefinido. Un dispositivo de ensayo de esta clase -
se muestra en la Figura 2 de los dibujos.

20 Como puede apreciarse en los dibujos, el dispo-
sitivo de ensayo comprende un recipiente tubular que tie-
ne una pared y una porción de fondo transparentes, adap-
tado para recibir el líquido a ser ensayado y provisto -
de un cierre impermeable. Se coloca en el recipiente un
25 gránulo de reactivo, por lo menos, preparado según la -
invención. El líquido a ensayar se aplica al gránulo o
gránulos abriendo el cierre e introduciendo una cantidad
medida del líquido, por medio de un cuentagotas.

30 Es evidente que los principios de la Invención
pueden aplicarse no solamente a la preparación de reac-
tivos analíticos, sino también a la preparación de for-



mas farmacéuticas de administración, en particular aquellas que llevan consigo dosis pequeñas del medicamento.

5 En el campo de la inmunología, mediante la selección de reactivos apropiados, los gránulos de ensayo puede emplearse para efectuar cualquier ensayo inmunológico en que se encuentren presentes, en el mismo tubo, - dos reactivos de ensayo incompatibles, como, por ejemplo, el ensayo del embarazo descrito antes más completamente, y también ensayo de sustancias de grupo sanguíneo en --
10 plasma y suero, determinación de grupo sanguíneo, y antígenos y anticuerpos de diversas clases, incluyendo factores reumatoides, antígenos de sífilis, antiestreptolisina O, mononucleosis infecciosa, y otros ensayos de aglutinación o precipitación. Además, con objeto de demostrar
15 a los usuarios del dispositivo de ensayo qué aspecto tiene una reacción propuesta o como ensayo testigo, puede tratarse un gránulo de la sustancia que se ensaya en una prueba separada junto con la muestra real a ensayar, utilizando dos tubos, por ejemplo, un gránulo liofilizado -
20 de orina conocida de embarazada.

Los ejemplos siguientes son indicativos de una realización de la Invención preferida al presente, pero no han de considerarse como limitativos de la Invención.

25 En los ejemplos siguientes se describe la preparación de un lote de gránulos de reactivo de ensayo para detectar gonadotropina coriónica humana en orina.

EJEMPLO I

Preparación de Gránulos de Antisuero de HCG

Los reactivos son:

30 Sacarosa 10,2 g.

11-4-70



Cloruro sódico 0,765 g

Fosfato disódico, heptahidrato
(Na₂HPO₄·7H₂O) 2,462 g

Fosfato monopotásico
(KH₂PO₄) 0,489 g

5 Agua destilada, cantidad suficiente
para 170,0 ml.

10 Anti-Gonadotropina Coriónica Humana-Cantidad suficiente para producir un factor de sensibilidad de 650 - 800 U.I. de HCG/litro y reacciones 5, 5, 3-1, 2-0 con orina a 0, 500, 750 y 1000 U.I./litro de orina, respectivamente, Una reacción de grado 5 es la aglutinación completa y de grado 0 es una inhibición completa.

15 Las sales anteriores se disuelven en 150 ml. de agua, aproximadamente. Se ajusta el pH de la solución resultante a 7,2 (± 0,05) con HCl 0,1 N ó NaOH 0,1 N. Se añade la cantidad necesaria de agua para llevar el volumen a 170 ml. Se enfría en un baño de hielo y se añade la cantidad exacta, previamente determinada, de suero anti-HCG para proporcionar la dilución requerida. Desde este punto, la solución se mantiene fría en un baño de hielo.

20 Se llena con este antisuero diluido un aparato limpio de entrega de pipeta cuentatogas de micro-título, de 0,05 ml. haciendo funcionar una bomba dosificadora, Auto-analizadora, hasta que han sido bombeados uno o dos mililitros, teniendo cuidado de eliminar las burbujas del tubo de liberación. Entonces se para la bomba y el aparato de liberación de micro-título, se coloca en su posición en la columna de congelación. La bomba se

377661



pone en funcionamiento y se comienza la fabricación de -
gránulos.

5 Cuando se sacan los gránulos de la columna de
congelación, se guardan bajo hexano en un recipiente ce-
rrado, o bien en una caja de hielo seco o en refrigera-
dor mecánico, mantenido entre -50°C y -60°C .

EJEMPLO II

Preparación de Gránulos de Eritrocitos Sensibi- lizados.

10 Se trata una suspensión de eritrocitos de oveja,
de la manera convencional, con formalina y tanino, y se
centrifuga y lava con un tampón de fosfato-cloruro sódi-
co de pH 6, 4 y después se incorpora a este tampón. A es-
ta mezcla se añade un volumen igual de una solución de 50
15 U.I. de HCG por ml, en un tampón de pH 6,4. La mezcla se
mantiene durante 48 horas a 37°C , y se añade después for-
maldehído hasta que se obtiene una concentración final -
de 0,25% (p/v) de formaldehído. A continuación se deja es-
ta mezcla durante 15 horas a 37°C , después de lo cual se
20 centrifugan de nuevo los eritrocitos, se lavan con solu-
ción salina fisiológica, se incorporan como suspensión al
10% v/v en una solución salina fisiológica que contiene
el 0,1% de seroalbúmina de bovino y se guarda, hasta que
se necesita, a 0° - 4°C . Después se centrifugan los eri-
trocitos, se lavan con solución salina fisiológica y se -
25 liofilizan de la forma habitual. Alternativamente, las cé-
lulas tratadas con formol y tanino se lavan y suspenden
en un tampón de fosfato-cloruro sódico a pH 7,6. Se añade
a esta mezcla un volumen igual de una solución de 50 U.I.
30 de HCG/ml. Se mantiene esta mezcla a 56°C durante 18 ho--



15 ABR 1970

ras, después se lava y vuelve a suspender en cloruro sódico al 0,9% y se mezcla, a partes iguales, con una solución de formaldehído (1,5%) en solución salina al 0,9%. Esta mezcla se deja a 22-24°C durante una semana, aproximadamente, después de lo cual se lavan de nuevo los eritrocitos con cloruro sódico al 0,9% y, finalmente, se suspenden, hasta una concentración del 6,6% en una mezcla de tampón de fosfato de pH 7,2, conteniendo el 6% de sacarosa y el 1,5% de sero-albúmina de bovino. Esta mezcla se liofiliza y se mantiene seca hasta que se necesita.

Los eritrocitos de oveja así sensibilizados mediante fijación química a su superficie de HCG, se suspenden en una mezcla de tampón y un diluyente tal como la sacarosa y la sero-albúmina de bovino, de manera que en cada 0,05 ml. esté contenida la cantidad óptima precisa para un solo ensayo de HCG.

Los gránulos de eritrocitos se obtienen reconstituyendo los eritrocitos sensibilizados, previamente liofilizados, hasta 5/6 del volumen primitivo, es decir, 12 ml de suspensión al 6,67%, liofilizada, en medio final de suspensión, se reconstituyen con 10 ml de agua destilada. Esta suspensión se bombea a una pipeta cuentagotas de micro-título. Se utiliza un tubo de polietileno de calibre fino (Diámetro interior = 0,023) para reducir a un mínimo la sedimentación de eritrocitos y la bomba no se desconecta durante el proceso, excepto momentáneamente.

La suspensión se convierte en gotas calibradas, como se ha indicado anteriormente, que se dejan caer a través de una columna de hexano, enfriada mediante una mezcla de hielo-seco-metil celosolve, variando la temperatura

11-4-70

- 14 -

377661



tura del hexano desde la del ambiente, aproximadamente, en su superficie más alta hasta -70°C cerca de la base de la columna. Los gránulos se recogen y guardan como - en el Ejemplo I.

5

EJEMPLO III

Preparación de Gránulos de tampón

Los reactivos son:

	Sacarosa	10,2 g
1	Cloruro sódico	0,765 g
10	Fosfato disódico, heptahidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2,462 g
	Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	0,489 g
	Sal Disódica del ácido etilendia mintetraacético	2,720 g
15	Agua destilada, c.s.p.	170,0 ml.
	Azul-Negro de Anilina (Negro ácido 1)	0,2 ml Solu- ción de reserva.

15

20

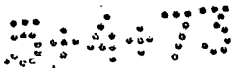
25

Se disuelven las sales anteriores en unos 150 ml de agua. Se ajusta la solución a un pH de 7,2 con -- NaOH 5,0 N, añadiéndose después la cantidad de agua necesaria hasta 170 ml. Se añaden entonces los 0,2 ml de la solución de reserva, de colorante, que consiste en una - solución de 1,0 mg/ml (manténgase en el refrigerador la solución colorante). Esta solución no necesita refrigerar se durante la producción de los gránulos.

30

Los gránulos de tampón se obtienen de manera - idéntica a la descrita para los gránulos de antisuero. La manipulación y almacenamiento subsiguientes a la producción son los mismos.

EJEMPLO IV



Método de efectuar el Ensayo de Embarazo.

Se colocan en el fondo del vial de ensayo, mos-
trado en la Figura 2 de los dibujos, uno de cada uno de -
los gránulos del antisuero, eritrocitos sensibilizados -
5 con HCG, y de tampón. Se introduce en el vial de ensayo,
mediante un cuentagotas, una muestra de la orina a ensa-
yar y después un volumen de agua igual a unas cuatro ve-
ces la cantidad de orina añadida. Se cierra de nuevo el
vial de ensayo y se agita, arriba y abajo, durante 30 se-
10 gundos, después de lo cual se le deja estar en reposo du-
rante un periodo de 2 horas. El fondo del vial se inspec-
ciona visualmente para apreciar una indicación positiva
o negativa de aglutinación. La obtención de un anillo de
15 forma de buñuelo es una indicación positiva de embarazo.

EJEMPLO V

Aplicación del Principio del Gránulo

En un ensayo de Diagnóstico Enzimático.

El principio del ensayo cinético U.V. para la -
20 valoración de la actividad de la transaminasa glutamato-
piruvato sérica, (S.G.P.T.) en suero, implica las reaccio-
nes siguientes:

(1) Reacción de valoración

L-alanina + ácido alfa-ceto glutárico G.P.T. ácido
25 pirúvico + ácido L-glutámico.

(2) Reacción indicadora

Acido pirúvico + NADH₂ L.D.H. ácido L-láctico + NAD.

En las ecuaciones anteriores, las abreviaturas signi-
fican:

30 G.P.T. - Transaminasa glutamato-piruvato



NADH₂ - Dinucleótido nicotinamida-adenina, forma reducida.

NAD - Dinucleótido nicotinamida-adenina, forma oxidada.

LDH - Deshidrogenasa de ácido láctico.

5 Por cada molécula de ácido pirúvico procedente de la reacción (1), se oxida a NAD una molécula de NADH₂. Se determina directamente en el U.V. la disminución de densidad óptica, a 334 nm, en una cubeta fotométrica, a 25°C.

(a) Preparación de gránulos tampón-enzima

10 Se preparan las siguientes soluciones reactivas:

Solución 1 : 250 ml. de solución acuosa 3 milimolar de dinucleótido nicotinamida-adenina, - reducido. La solución, reciente, se mantiene a 0°C - 4°C hasta que se necesita.

15 Solución 2: 500 ml de solución acuosa de deshidrogenasa de ácido láctico, teniendo, al menos, 180.000 U.I. de actividad de LDH, por litro.

20 La solución, reciente, se mantiene a 0°C-4°C hasta que se necesita.

Solución 3: 1250 ml de solución acuosa 0,2 molar de L-alanina.

25 Solución 4: 3000 ml de una solución acuosa que es 5 milimolar en ácido etilendiamintetraacético y 50 milimolar en trietanolamina. El pH de esta solución se ha ajustado a 7,5.

Las soluciones 3 y 4 se mezclan a fondo y se enfrían hasta 0°C-4°C. Después se añaden las soluciones 1 y 2 y la solución se agita a fondo.

30 Los gránulos de tampón-enzima, se preparan par-

2473



5 tiendo de la mezcla anterior, como se indica en el Ejemplo I. Estos se llenan en pequeños viales de polietileno, como los que se indican en la Figura 2, conteniendo cada vial el número de gránulos que corresponden a 0,5 ml. de la solución tamponada.

Después de liofilización, se cierran los viales con un tapón a rosca, rojo.

(b) Preparación de gránulos de tampón-sustrato:

Se preparan las siguientes soluciones reactivo:

10 Solución 5: 200 ml de solución acuosa 0,2 molar de alfa-ceto glutarato sódico. La solución, reciente, se mantiene a 0° - 4°C hasta que se necesita;

15 Solución 6: 800 ml de una solución acuosa que tiene la composición de la solución 4
Se enfría la solución 6 hasta 0° - 4°C y después se mezcla a fondo con la solución 5.

20 Se preparan, según el Ejemplo I, gránulos de tampón-sustrato de 0,1 ml de esta solución mixta. Se llenan en pequeños viales de polietileno, como los mostrados en la Figura 2, conteniendo cada vial un gránulo. Después de liofilizar, se cierran los viales con tapón a rosca, azul.

25 (c) Realización del ensayo cinético U.V.:

A un vial, preparado como se ha indicado en este ejemplo bajo (a), se añaden 0,5 ml de agua destilada y 0,2 ml del suero a valorar, empleando pipetas Marburg. Después de agitar, la solución resultante se lleva, cuantitativamente, a 25°C, a la cubeta de un espectrofotómetro "Eppen-

377661



dorf^m. La pre-incubación tiene lugar durante unos 10 minutos. Durante este tiempo el sustrato endógeno existente - en la muestra se está transformando. Se lee la densidad - óptica hasta que es constante. Entonces se abre uno de -
5 los viales con tapón azul y se añade 0,1 ml. de agua destilada con una pipeta Marburg. La solución transparente - se lleva después, cuantitativamente, a la cubeta y se mezcla a fondo.

10 Se hacen lecturas de la densidad óptica cada 30 segundos, y se anota la disminución durante 2 minutos al menos. Los valores obtenidos se promedian y la actividad - de S.G.P.T. de la muestra se calcula empleando la fórmula:

$$U.I. = \Delta D.O./min \times 667 / \mu mol \times min^{-1} \times litro^{-1}.$$

15 La presente solicitud que corresponde a la presentada en Estados Unidos de América, con fecha 20 de Marzo de 1.969, bajo el número 808.803, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

20

- REIVINDICACIONES -

25

30

Los puntos de invención, propia y nueva, que -

11-4-70

- 19 -

377661

28 AGO 1972



se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España por VEINTE años, son los siguientes:

5
10
15
20
25
1.- Un procedimiento para la preparación de una composición de reactivo de ensayo analítico, inmunológico o de diagnóstico que contiene una cantidad pre-determinada de una sustancia antiférrica, antigénica, enzimática o tampón, caracterizado por las etapas de:
(a) formar una solución o suspensión acuosa del reactivo que tiene una concentración previamente determinada; (b) formar una gota, exactamente medida o calibrada, que cae libremente, de dicha solución o suspensión; (c) dejar caer dicha gota a través de una masa de un líquido inmiscible con agua, que tiene una densidad menor que la del agua y que posee un gradiente de temperatura que varía desde la temperatura ambiente, aproximadamente, en su superficie más alta, hasta, a lo sumo, una temperatura por debajo del punto de congelación de la solución que se está congelando, en la parte inferior de la columna, congelando con ello dichas gotas obteniendo gránulos o perlas, congelados; (d) recoger los gránulos congelados que contienen una cantidad previamente determinada del reactivo, en el fondo de dicha masa de líquido; y (e) liofilizar los gránulos congelados, recogidos.

22.8.72

20 -

377661

28 AGO.



2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por tener la gota que cae libremente un volumen comprendido entre unos 0,025 y unos 0,07 ml.

5 3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por utilizar como líquido inmiscible con agua un hidrocarburo, un hidrocarburo halogenado o sus mezclas.

10 4.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por ser la velocidad de caída de la gota a través del líquido inmiscible con agua, de unos 15 cm. por segundo y mantener la temperatura de la porción más alta de la masa de líquido inmiscible con agua, en una temperatura comprendida entre unos 0°C y la temperatura ambiente.

15 5.- Un procedimiento para la preparación de una composición de reactivo de ensayo analítico, inmunológico o de diagnóstico.

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

25

22.8.72

377661

28 AGO 1972



Esta Memoria consta de veintidos hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.

28 AGO. 1972

Madrid,

P.A.


Alberto de Elzaburu
Por Poder,

22.8.72/RTA.-

377661

377661

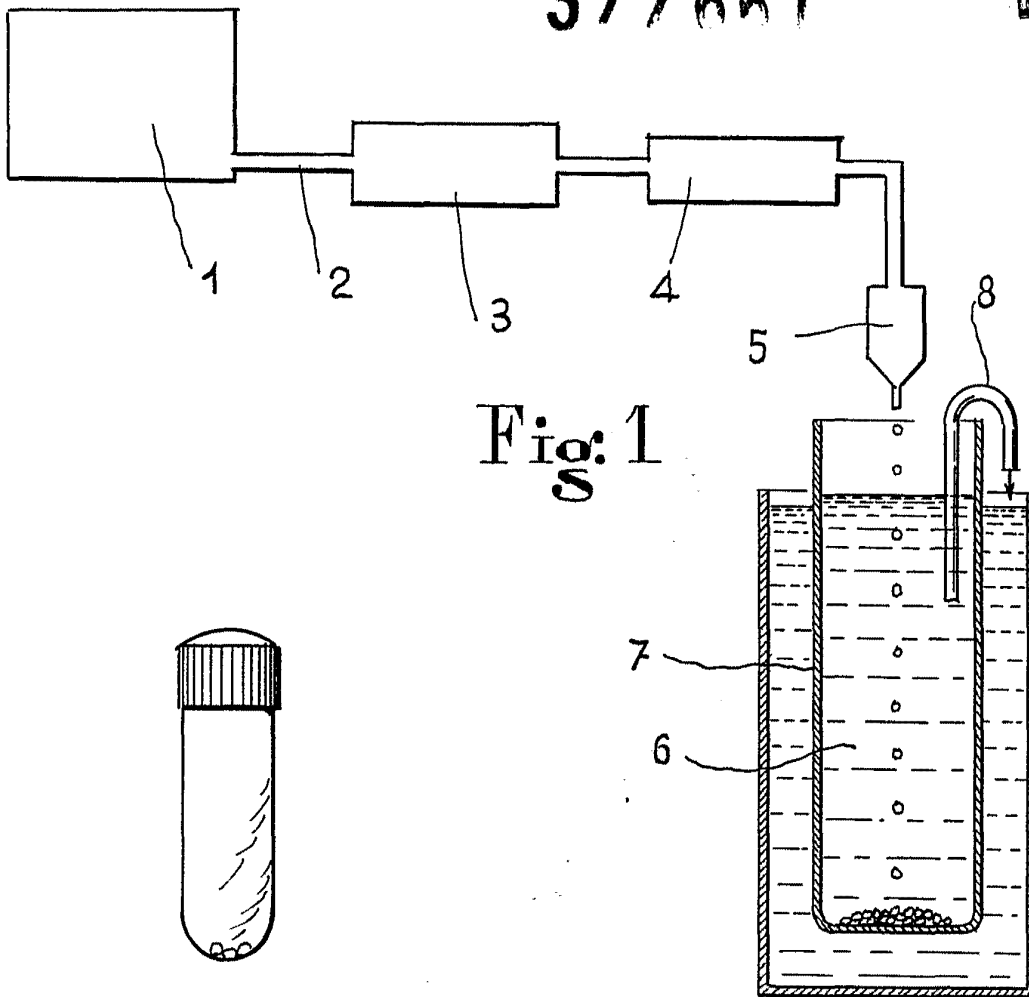


Fig: 1



Fig: 2

ESCALA VARIABLE

Alfonso de Mendota
Por Fedor