



(13) ES	(11) NUMERO 441.489	(10) A1
	(22) FECHA DE PRESENTACION 3.10.75	

P.- 61.333

PATENTE DE INVENCION

(40) PRIORIDADES:	(32) FECHA	(33) PAIS
(31) NUMERO 511.952	4.10.74	EE.UU.

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
--------------------------	----------------------------------	--

(54) TITULO DE LA INVENCION
"UN METODO DE ENSAYO RADIOLOGICO DE UNA MUESTRA PARA UNA LUSTAN
CIA BIOLOGICA"

(71) SOLICITANTE (S)
SMITHKLINE INSTRUMENTS, INC.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
880 West Maude Avenue, Sunnyvale, California 94086, Estados
Unidos de América

(72) INVENTOR (ES)
Michael James Barrett

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE
D. OSCAR DE ELZABURU FERNANDEZ

Esta invención se refiere a un método para fijar covalentemente sustancias a materiales plásticos, y a determinaciones inmunológicas que emplean tales sustancias fijadas.

5 En ensayos radioinmunológicos o ensayos radiológicos de fijación de proteínas competitivas, el compuesto a determinar, generalmente el antígeno, se deja competir con un compuesto similar o un compuesto radiactivo químicamente afín por un número limitado de puntos de fijación
10 en los anticuerpos o en las proteínas de fijación específicas. El compuesto marcado con isótopos radiactivos fijado a los anticuerpos se separa luego del compuesto marcado libre y se determina. Los métodos de separación utilizados corrientemente, por ejemplo, electroforesis,
15 filtración con gel, precipitación de antígeno libre con carbón vegetal y precipitación de antígeno fijado con sal o con otro anticuerpo, a menudo consumen mucho tiempo, son complicados y no proporcionan una separación de corte claro. La fijación de anticuerpos a la pared de
20 un tubo de ensayo permite la separación del antígeno fijado y libre por simple decantación.

Es un objeto de esta invención proporcionar sustancias fijadas covalentemente a materiales plásticos que son útiles en ensayos radioinmunológicos.

25 Es un objeto adicional de esta invención proporcio

nar un método de fijar covalentemente sustancias a materiales plásticos.

5 Es otro objeto de esta invención proporcionar un método de ensayo radioinmunológico para sustancias biológicas que incluye utilizar contrapartidas inmunológicas fijadas covalentemente, tales como anticuerpos.

Es un objeto adicional proporcionar un material de ensayo radiológico constituido por sustancias fijadas covalentemente a materiales plásticos.

10 Estos y otros objetos análogos se consiguen como sigue. Los anticuerpos, proteínas de fijación específicas u otro material proteínico tal como enzimas, se unen covalentemente a través de sus grupos amino y otros grupos reactivos a grupos aldehído activos de dialdehídos alifáticos, tales como aldehído glutárico, que se han polimerizado previamente sobre la superficie interior de un material plástico, tal como un tubo de ensayo de material plástico, por ejemplo un tubo de ensayo de polipropileno o de polietileno.

20 El aldehído glutárico polimerizado puede unirse, a su vez, a aminas primarias alifáticas de la fórmula general $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$, en la que n es un número entero comprendido entre 5 y 20, preferiblemente 18, o diaminas alifáticas de la fórmula general $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}_2$,
25 en la que n y m son números enteros comprendidos entre

3 y 20, preferiblemente tales que n es 18 y m es 3. En esta realización de la invención, antes de la reacción con el aldehído glutárico el material plástico se calienta en una solución de la amina o diamina (como se han de
5 finido arriba) a temperaturas superiores a 50°C, preferiblemente a 90°C. El exceso de amina o diamina se elimina por lavado y el plástico se trata con una solución de aldehído glutárico a la temperatura ambiente, o a una
10 temperatura ligeramente alta, por ejemplo a 56°C, durante un período de tiempo que puede ser desde 1 a 2 horas hasta 1 a 2 días. Así pues, está dentro del alcance del método de esta invención que el aldehído glutárico se polimerice directamente sobre la superficie interior de un material plástico tal como un tubo de ensayo de plástico,
15 con o sin tratamiento previo con una amina o diamina alifática.

Con objeto de llevar a cabo un ensayo radiológico, una mezcla que contiene tampón, antígeno marcado o análogos y antígeno sin marcar o análogos de un fluido biológico, tal como suero, o de una solución patrón, se
20 incuba en un tubo de ensayo de plástico con anticuerpo u otra proteína de fijación específica fijada covalentemente a la superficie interior del tubo de ensayo de acuerdo con el método de esta invención. Después de un período de
25 incubación adecuado, el antígeno libre se separa rápida-

mente y de modo sencillo por decantación, sin dejar tiempo para que se reajuste el equilibrio establecido. El an
tígeno radiactivo fijado al tubo de ensayo se determina
5 por recuento después que el tubo se ha enjuagado con tam-
pón. El procedimiento completo es sencillo y rápido, y
no se requiere habilidad especial alguna para el mismo.

Se cree que se produce una autopolimerización del ma
terial aldehídico en la superficie del plástico seguida
por una copulación, del tipo de la base de Schiff, de la
10 proteína con el grupo aldehído activo.

La expresión "contrapartida inmunológica" utilizada
en esta memoria, denota, o bien un antígeno o un anticueru
po que reacciona específicamente con el anticuerpo o an-
tígeno correspondiente. La expresión "sustancia biológi
15 ca" utilizada en esta memoria denota un material de ori-
gen biológico tal como un antígeno, anticuerpo o enzima,
todos los cuales son capaces de reaccionar químicamente
con un grupo aldehído. Los grupos amino que no han reac-
cionado presentes en las cadenas proteínicas de la mayoría
20 de las sustancias biológicas proporcionan tales grupos
químicamente reactivos.

TRATAMIENTO DE LOS TUBOS DE PLÁSTICO

Se introduce una solución acuosa de aldehído glutá-
25 rico en un tubo de ensayo de plástico, por ejemplo un tu

bo de ensayo de polipropileno o de polietileno, y se de-
ja que permanezca en contacto con la superficie interior
del tubo de ensayo a la temperatura ambiente o a una tem-
peratura ligeramente elevada, por ejemplo 56°C, durante
5 un período de tiempo tal como 1 a 2 horas pero que puede
llegar a ser hasta de 1 o 2 días. El aldehído glutárico
se polimeriza en la superficie del plástico y forma una
capa delgada de polímero sobre la superficie interior
del tubo de ensayo de plástico con un gran número de gru-
10 pos aldehído activos que pueden reaccionar covalentemen-
te con los grupos amino primarios de anticuerpos o proteí-
nas.

La polimerización del aldehído glutárico tiene lugar
en un intervalo amplio de pH, a saber desde 3 a 10. Asi-
15 mismo, la solución de aldehído glutárico se polimeriza
sobre las superficies de plástico en un intervalo amplio
de concentraciones de aldehído, a saber, 0,1, 0,2, 0,5,
1 ó 2% de aldehído glutárico. La cantidad de polímero
de aldehído glutárico, y por consiguiente el número de
20 grupos aldehído activos en la superficie de plástico, pue-
de aumentarse o disminuirse variando la concentración de
la solución de aldehído, el tiempo de incubación y la tem-
peratura. El exceso de grupos aldehído activos existen-
tes en la superficie de plástico que no se consumen en
25 la copulación subsiguiente con la proteína, puede blo-

quearse por reacción con compuestos que tengan grupos amino primarios tales como monoetanolamina o lisina.

Una vez que el aldehído glutárico se ha polimerizado sobre la superficie del tubo de ensayo, la solución de aldehído se elimina por aspiración y el tubo se lava cuidadosamente con agua desionizada. Los tubos así preparados están listos para ser utilizados en un ensayo radiológico que comprenda copulación con proteínas o con anticuerpos. Los tubos tratados con aldehído son muy estables y conservan su aptitud para copularse con proteínas incluso después de lavados con soluciones concentradas de sal y con detergentes.

COPULACION COVALENTE CON LOS TUBOS TRATADOS

Los anticuerpos y las proteínas se copulan con los grupos aldehído activos existentes en la superficie del tubo de ensayo tratado con aldehído glutárico a través de sus grupos amino primarios. La velocidad y la cantidad de proteína copulada con los tubos de ensayo es directamente proporcional a la concentración de la solución de proteína utilizada. No obstante, la cantidad máxima de proteína que puede copularse a la superficie está regida por el tamaño de la molécula de proteína y por el área de la superficie de plástico. Utilizando gammaglobulina (γ G) marcada con yodo 125, de peso molecular 170.000, co

me: protefina modelo, los datos experimentales indican que aproximadamente 1,2 μg de γG es la cantidad máxima que puede copularse a 1 cm^2 de una superficie de plástico tratada con aldehído glutárico. Esta cantidad es aproximadamente igual a la masa teórica calculada de gammaglobulina que se requiere para formar una monocapa de gammaglobulina sobre la superficie de plástico tratada con aldehído glutárico. La molécula de γG es una elipse con diámetros de 44 \AA y 235 \AA . Si la molécula de γG se copula con la superficie de plástico tratada con aldehído glutárico a lo largo de su eje más corto, entonces la masa de γG requerida para formar una monocapa de 1 cm^2 de superficie será:

$$15 \quad \frac{1 \text{ cm}^2}{44 \times 44 \times 10^{-6} \text{ cm}^2} \times \frac{1}{6,023 \times 10^{23}} \times 170.000 \text{ g} = 1,5 \mu\text{g}$$

de γG .

Una solución de anticuerpos comprendida entre 1 y 100 μg de protefina por ml de tampón se suministra a un tubo tratado con aldehído glutárico y se deja que permanezca en contacto con la superficie tratada a 4 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 horas. La solución de anticuerpos se separa por aspiración y, después de enjuagar el tubo completamente con tampón, dicho tubo se puede utilizar inmediatamente para ensayos radicinmunológicos o puede guardarse durante meses hasta

su empleo. Los tubos revestidos con anticuerpos son excelentes para ensayos radioinmunológicos y dan resultados reproducibles, debido a que (1) el anticuerpo copulado covalentemente con el tubo de ensayo es muy estable y no puede eliminarse por lavado, (2) los anticuerpos así copulados con la pared retienen su reactividad inmunológica durante un largo período de tiempo, y (3) se puede copular una cantidad cuantificada y precisa de anticuerpos en cada tubo controlando la concentración de la solución de copulación. Es ilustrativo el experimento que sigue:

5 (A) Se introducen 2 ml de aldehído glutárico al 0,1% en tampón de carbonato 0,1M, de pH 9,0, en cada uno de 50 tubos de polipropileno que miden 1,1 x 5,5 cm. Los tubos se incuban durante 3 horas a 56°C, se enfrían a la temperatura ambiente, y se separa la solución de aldehído por aspiración. Se lavan los tubos 10 veces con agua desionizada.

15 (B) Se prepara una solución de gammaglobulina humana marcada con I^{125} , a una concentración de 15 µg de proteína por ml de tampón de fosfato 0,1M de pH 7,0, y se introducen 2 ml de la solución de gammaglobulina humana (HGG) en cada uno de los tubos tratados con aldehído glutárico. Se efectúa el recuento de la cantidad de I^{125} suministrada a cada tubo

20 (79.398 ± 514 cpm). La solución de HGG marcada con

25

I^{125} se deja en el tubo a 4°C durante 15 horas. Después del período de incubación, se separa por aspiración la solución de HGG marcada con I^{125} . Se recuenta la cantidad de HGG marcada con I^{125} fijada a la pared, después de haber enjuagado cuidadosamente los tubos. La cantidad de HGG marcada con I^{125} copulada con la pared tiene un valor medio de 3,013 $\mu\text{g} \pm 0,067 \mu\text{g}$ (representado por 7975 ± 178 cpm), con un coeficiente de varianza de 2,24. La HGG marcada con I^{125} copulada con la superficie tratada con aldehído no puede separarse por lavado con S.D.S. al 1% (laurilsulfato de sodio o sulfato de dodecilo y sodio). En cambio, la HGG marcada con I^{125} absorbida no específicamente en las superficies de plástico que no se han tratado con aldehído glutárico puede separarse por lavado con S.D.S. al 1%. Los tubos revestidos con HGG marcada con I^{125} se guardan a 4°C, luego de introducir en ellos 3 ml de tampón de fosfato 0,1M. Los tubos se sacan a intervalos semanales, se sacuden, y se vuelve a determinar la cantidad de HGG marcada con I^{125} que queda copulada en los mismos. No se observa disminución alguna apreciable en la cantidad de HGG marcada con I^{125} copulada con la pared, al cabo de un período de 6 meses o mayor.

El ejemplo que sigue ilustra el empleo de la presente invención aplicado al ensayo radioinmunológico de tiroxina en el suero. Este ejemplo debe interpretarse como

meramente ilustrativo, y no limitante en modo alguno. Además de anticuerpos, proteínas de fijación específica tales como el factor intrínseco para la determinación de vitaminas B₁₂ y determinación de β -lactoglobulina en ácido fólico se pueden copular covalentemente con los tubos tratados con aldehído glutárico. En otros ejemplos, incluso el antígeno, por ejemplo tiroxina, puede copularse covalentemente con el tubo de ensayo y utilizarse para la determinación de globulina fijadora de tiroxina en el suero.

EJEMPLO 1

- (A) Se suministran 2 ml de aldehído glutárico al 0,1% en tampón de carbonato 0,100M, de pH 9,0, a cada uno de los tubos de polipropileno de 1,1 x 5,5 cm, se incuban a 56°C durante 2 horas, se enfrían a la temperatura ambiente, y se separa la solución de aldehído por aspiración. Los tubos tratados con aldehído se lavan 10 veces con agua desionizada.
- (B) Se obtiene el antisuero de la tiroxina por inmunización de conejos con conjugado de Seroalbúmina T₄ de Bovino. El anticuerpo de la Seroalbúmina T₄ de Bovino se obtiene haciendo pasar el antisuero a través de una columna de dietilaminoetilcelulosa equilibrada con tampón de fosfato 0,01M de pH 6,8. Se

recoge la fracción de gammaglobulina que contiene los anticuerpos de T_4 , se determina la concentración de proteína por el método de Lowry [U.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A. L. Farr, y R.J. Randall, "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent", J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)] y se diluyen las fracciones a 15 μ g por ml de tampón de fosfato 0,1M de pH 7,0.

(C) Se introducen 2 ml de la solución de anticuerpos en cada uno de los tubos tratados con aldehído glutárico, se dejan en reposo a 4°C durante una noche, se decantan, se enjuagan una vez con tampón de fosfato 0,1M de pH 7,0, una vez con cloruro de sodio al 0,9% con Seroalbúmina de Bovino al 1%, de pH 7,0, una vez con tampón de fosfato 0,05M de pH 7,4 con azida de sodio al 0,05%, cloruro de sodio al 0,9%, Seroalbúmina de Bovino al 0,3%, y Tween 20 al 0,05%. Todos los viales tratados se secan con aire.

(D) Ensayo de la tiroxina

(1) Se pipetea 20 λ de muestras de suero y patrones en un intervalo de concentraciones de 0, 2,5, 5, 10, y 20 μ g por ciento en viales convenientemente etiquetados revestidos con anticuerpos de T_4 .

(2) Se introducen en cada vial 2 ml de tampón de tris-maleato 0,1 M, de pH 8,2 \pm 0,2 que contiene 300 μ g de sal de sodio del ácido 8-anilino-naftalenosulfónico; 200 μ g de salicilato de sodio y 0,5 ng de $T_4 I^{125}$ con

aproximadamente 39.500 cpm.

(3) Se mezcla con turbulencia. Se incuba a la temperatura ambiente durante 60 minutos.

5 (4) Se decanta, separando las últimas gotas de la mezcla de reacción por inversión de los viales sobre una toalla de papel.

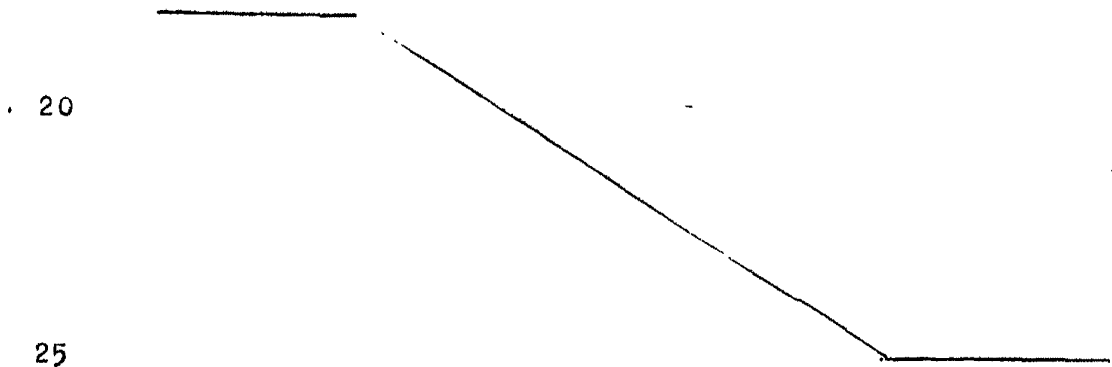
(5) Se efectúa el recuento del contenido de todos los viales en un contador gamma.

(E) Resultados

10 (1) Se computa B/B_0 como sigue:

$$\frac{\text{recuentos netos de patrones o muestras}}{\text{recuentos netos del patrón cero}} \times 100\%$$

15 (2) Se construye la curva patrón de T_4 y se determinan los valores de las muestras "desconocidas" en μg por ciento a partir de la curva patrón como en el ejemplo siguiente:



	Tubo	cpm	cpm netos	% Fijado	% Fijado Medio	Valor de T ₄ en µg por ciento
	Efecto de fondo de la máquina	138 139	-	---	---	---
5	0 µg de patrón de T ₄	12096 11643	11958 11505		100%	
	2,5 µg por ciento de patrón de T ₄	9258 9219	9120 9081	77,7 77,4		77,6%
	5,0 µg por ciento de patrón de T ₄	7511 7347	7373 7209	62,8 61,5		62,2%
10	10,0 µg por ciento de patrón de T ₄	5652 5806	5514 5668	47,0 48,3		47,7%
	20,0 µg por ciento de patrón de T ₄	4152 3986	4014 3848	34,2 32,8		33,5%
	Muestra desconocida N° 1	6931 6902	6793 6764	57,9 57,7		6,2 µg%
15	Muestra desconocida N° 2	5052 4857	4883 4719	41,6 40,2		40,9% 14,0 µg%

20 (F) Se observa una disminución del 10% en la concentración de proteínas después que la solución de anticuerpos de T₄ se utiliza una sola vez para revestir tubos tratados con aldehído glutárico. Esta solución de anticuerpos de T₄ puede volver a utilizarse para revestimiento de tubos después que la concentración de la solución

25

de anticuerpos de T₄ se reajusta a 15 µg de proteína por ml.

EJEMPLO 2

5

DETERMINACION DE VITAMINA B₁₂ EN EL SUERO

(A) Preparación del tubo revestido con Factor Intrínseco

10 (1) Se introducen 4 ml de octadecilamina 8 mM en tam
pón de acetato de sodio 0,1M de pH 5,0 en cada
uno de los tubos de polipropileno de 1,1 x 5,5 cm,
se incuba a 97°C durante 2 horas, se enfría a la
temperatura ambiente, se separa por decantación
la solución de octadecilamina, y se lavan los tu-
bos 10 veces con agua desionizada.

15 (2) Se añaden 4 ml de aldehído glutárico al 2% en tam
pón de carbonato 0,1M de pH 9,0 a cada uno de los
tubos tratados con amina, se incuba a 56°C duran-
te 2 horas, se enfría a la temperatura ambiente y
se separa la solución de aldehído por aspiración.
Los tubos tratados con amina y con aldehído se la
20 van 10 veces con agua desionizada.

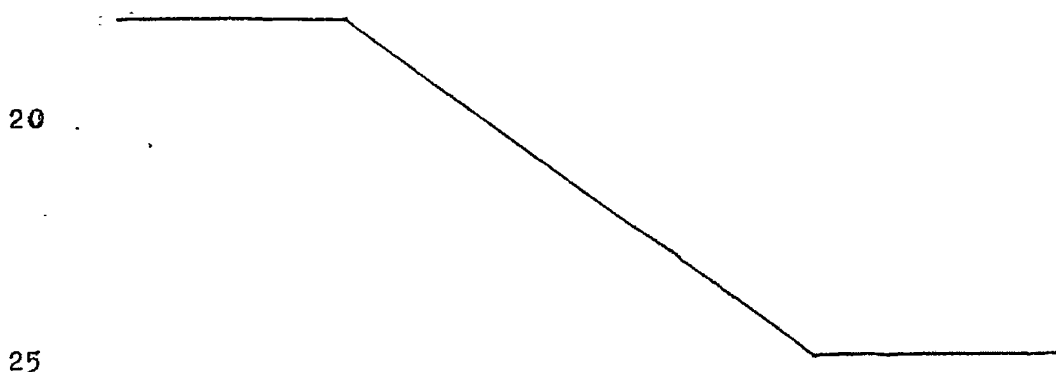
(3) Se suministran 3 ml de factor intrínseco de con-
centración 100 µg de proteína por ml de tampón de
fosfato 0,1M de pH 6,0 a cada uno de los tubos tra-
tados con amina y aldehído, se deja permanecer en
25 reposo a 4°C durante una noche, se separa por de-

contación la solución del factor intrínseco y se lava el tubo revestido 10 veces con agua desionizada.

(B) Determinación de B₁₂

- 5 (1) Se ponen 3 ml del tampón de ensayo en cada tubo revestido con el factor intrínseco: glutamato 0,04M de pH 4,0 con 4 µg de cianuro por ml.
- (2) Se añaden 100 λ de patrón de B₁₂ que contienen 0, 20, 40, 80, 160, 320 y 640 picogramos (pg) de B₁₂.
- 10 (3) Se añaden 50λ de B₁₂ marcada con Co⁵⁷ que contiene 20 pg de B₁₂ marcada con Co⁵⁷ con 38.000 cpm.
- (4) Se agita con turbulencia y se deja en reposo a la temperatura ambiente durante 1 hora.
- 15 (5) Se decanta, se enjuaga el tubo 2 veces con tampón de ensayo, y se efectúa la determinación.

(C) Resultados



	Patrón de B_{12} (pg) añadido en 12 un v_o lumen de 100λ	B_{12} marcada con Co^{57} (cpm), fijado al tubo	$B/B_o \times 100$
	0	1057	100%
5	0	891	
	20	835	84,9%
	20	860	
	40	843	82,1%
	40	805	
10	80	660	70,1%
	80	788	
	160	544	52,1%
	160	601	
	320	457	39,1%
15	320	472	
	640	390	30,9%
	640	402	
	Efecto de fondo	138	

20 Por conveniencia, los tubos de plástico tratados con aldehído preparados de acuerdo con esta invención se encuentran disponibles en un estuche para el ensayo, por ejemplo como sigue:

25

ENSAYO DE DIAGNOSTICO DE T₄ ABREVIADO (25 ensayos)

(A) Contenido del estuche de ensayo de T₄ (guárdese a 2-
-5°C)

- 5 (1) 25 Inmuntubos - con anticuerpos de T₄ (de conejo)
copulados covalentemente con el interior de los
tubos;
- (2) 5 viales de suero patrón - (humano) viales de 0,5
ml a 0, 2,5, 5,0, 10,0, y 20,0 µg/100 ml;
L-tiroxina (suero humano conteniendo azida de sodio).
- 10 (3) 1 vial de tampón de ensayo - cuando se disuelve en
55 ml de agua, las concentraciones son:
2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol (TRIS) 0,1M,
ácido maleico 0,025M, salicilato de sodio 0,62 mM,
y ácido 8-anilino-1-naftalensulfónico (ANS) 0,47
15 mM;
- (4) 1 vial de T₄I¹²⁵ (tiroxina - I¹²⁵) que contiene me
nos de 1,0 microCuries.

(B) Procedimientos

- 20 (1) Se deja que todos los reactivos y las muestras de
suero se equilibren a la temperatura ambiente an-
tes de su empleo. Se realizan todos los procedi-
mientos a la temperatura ambiente.
- 25 (2) Se disuelve el contenido del vial etiquetado como
ANS-Tampón de salicilato en 55 ml de agua desioni-
zada.

- (3) Se transfiere la solución de $T_4 I^{125}$ radiactivo al vial de ANS-Tampón de salicilato por doble enjuagado del vial etiquetado Solución de $T_4 I^{125}$ con ANS-Tampón de salicilato.
- 5 (4) Se pipetea 20 μ l de muestras de suero y patrones en inmunotubos revestidos con anticuerpos de T_4 etiquetados adecuadamente.
- (5) Se añaden con un pipeteador automático 2 ml de mezcla $T_4 I^{125}$ -ANS-Tampón de salicilato a cada uno de los viales de reacción.
- 10 (6) Se mezcla con turbulencia. Se incuba a la temperatura ambiente durante 60 minutos.
- (7) Se decanta y se desecha la mezcla de reacción, eliminando la última gota de líquido por inversión de los viales sobre una toalla de papel.
- 15 (8) Se efectúa el recuento de todos los viales en un contador gamma.
- (9) Se computa B/B_0 como sigue:
- 20
$$\frac{\text{recuentos netos de patrones o muestras}}{\text{recuentos netos del patrón cero}} \times 100\%$$
- (10) Se construye la curva patrón de T_4 y se determinan los valores de las muestras "desconocidas" en μ g por ciento a partir de la curva patrón.
- 25 La Patente de los EE.UU. 3.634.123 describe un método

do de tratamiento de una superficie de plástico para retardar la coagulación de la sangre que comprende tratar la superficie con un agente tensioactivo catiónico y tratar posteriormente con un anticoagulante tal como heparina. El método requiere que la sustancia proteínica (heparina) tenga una carga negativa neta al mismo pH al que está cargado positivamente el agente tensioactivo catiónico (amina). Lagergren, H. R. y Eriksson, J. C., Trans. Amer. Soc. Int. Organs, 17:10 (1971), describen la mejora consistente en su mergir una superficie de polímero plástico heparinizado en una solución de aldehído glutárico al 1% para reticular de este modo las moléculas de heparina. El aldehído, sin embargo, se introduce después que la proteína se ha absorbido iónicamente en la superficie.

15 La Patente de los EE.UU. 3.553.310 describe un método de revestimiento de partículas soporte que tienen superficies proteínicas con un material aldehídico que son útiles después para ensayos inmunológicos.

20 La Patente de los EE.UU. 3.646.346 describe un método de adsorción en la superficie de un tubo de ensayo de un anticuerpo y el empleo subsiguiente del tubo revestido en un ensayo radioinmunológico. El anticuerpo se adsorbe directamente a la superficie del tubo.

25 La Patente británica 1.257.263 describe un método de formación de puentes unidos covalentemente entre moléculas

de proteína con o sin formación de tales puentes entre el
substrato y la sustancia proteínica. Las proteínas esta-
bilizadas no entran en consideración para uso en ensayos
radioinmunológicos. No se conoce descripción alguna de
5 revestimiento de una superficie substrato con un material
aldehídico antes de la introducción de una sustancia pro-
teínica.

Así pues, las descripciones de la técnica
anterior incluyen la fijación de heparina a tubos de po-
lipropileno tratados previamente con diaminas alifáticas,
10 seguida por tratamiento de la superficie con aldehído glu-
tárico, la reticulación de las proteínas con aldehído glu-
tárico para uso en la preparación de inmoadsorbentes, y
el uso de tubos de plástico revestidos con anticuerpos sin
15 pretratamiento con aldehído en ensayos radioinmunológicos.
No se conoce publicación alguna acerca del uso de tubos de
plástico, revestidos con aldehído glutárico polimerizado
con o sin polímeros de aminas alifáticas antes de la apli-
cación de anticuerpos, en procedimientos de ensayo radioin-
20 munológicos.

REIVINDICACIONES

5

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 que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Un método de ensayo radiológico de una muestra para una sustancia biológica, que incluye emplear un producto formado tratando la superficie interior de un material plástico con glutaraldehído, seguido por unir covalentemente una contrapartida inmunológica de dicha sustancia biológica a la superficie tratada con glutaraldehído.

15

2ª.- El método de la reivindicación 1ª, en el que la superficie del material plástico se hace reaccionar con una amina o diamina primaria alifática antes de la reacción con aldehído glutárico.

20

3ª.- El método de la reivindicación 1ª, en el que la sustancia biológica es una proteína.

4ª.- El método de la reivindicación 1ª, en el que la sustancia biológica es una proteína de fijación específica existente en la naturaleza o un anticuerpo.

25

5ª.- El método de la reivindicación 1ª, en el que la sustancia biológica es una enzima.

6ª.- El método de la reivindicación 1ª, en el que el material plástico es polietilenos o polipropileno.

7ª.- El método de la reivindicación 2ª, en el que la amina alifática es $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{NH}_2$ y la diamina alifática es $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$.

8ª.- El método de la reivindicación 1ª, en el que el material plástico se encuentra en forma de una longitud de tubo.

9ª.- El método de la reivindicación 1ª, en el que el material plástico se encuentra en forma de un tubo de ensayo.

10ª.- El método de la reivindicación 1ª, que incluye las operaciones de emplear un tubo de ensayo de plástico tratado, incubar en dicho tubo de ensayo una solución que contiene un tampón, un derivado marcado radioactivamente de la sustancia biológica que ha de ensayarse, y la sustancia biológica no marcada que ha de ensayarse a partir de una muestra o de una solución patrón de dicha sustancia, decantar la mezcla de incubación, contar con un dispositivo de detección radioactivo la cantidad de derivado radioactivo marcado de dicha sustancia que permanece en la superficie interior de dicho tubo de

