18 D

443619

P.- 61.737

BD-9502-SP-1

Int. Cl.²: G 01 N

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION

A nombre de UNION CARBIDE CORPORATION

entidad norteamericana

establecida en 270 Park Avenue, Nueva York, Nueva York 10017, Estados Unidos de América.

por: "APARATO DE ENSAYO PARA ANALIZAR UNA PLURALIDAD DE MUESTRAS LIQUIDAS".

18 DIC

La presente invención está dedicada al ensayo o análisis de flúidos. Más en particular, la presente invención está dedicada a la determinación de la concentración de una sustancia en una muestra flúida, por ejemplo, suero, haciendo reaccionar una muestra flúida con uno o más reactivos y separando, por centrifugación, los constituyentes de reacción para obtener, con exactitud, una indicación de la concentración de la sustancia de interés.

En el análisis de flúidos, por ejemplo de suero, es impotante, frecuentemente, determinar en una muestra flúida, la concentración de sustancias, tales como hormonas tiroideas, hormonas sexuales, glicósidos cardíacos, vitaminas y antígenos del cáncer. Además, es extremadamente importante que tales concentraciones se determinen con exactitud y con rapidez.

Las técnicas anteriores comprendían largas operaciones individuales de mezclado, reacción, separación y medición.

Es un objeto de la presente invención, proporcionar un método para determinar rápida y exactamente, la concentración de substancias en flúidos.

Otros objetos resultarán evidentes de la siguiente memoria descriptiva y reivindicaciones tomadas conjuntamente con los dibujos, en los que

la figura 1 es una vista en alzado lateral de un

aparato adecuado para ser utilizado en la práctica de una realización de la presente invención,

la figura 2 es una vista en planta parcial del aparato de la figura 1,

la figura 2(a) es una vista fragmentaria de una parte del aparato mostrado en la figura 2,

la figura 3 es una representacion algo esquemática de una disposición de medición para ser utilizada de acuerdo con la presente invención,

la figura 4 es una representación de una gráfica del tipo que puede ser utilizado como norma de referencia de acuerdo con la presente invención,

las figuras 5(a), (b) y (c) ilustran esquemáticamente el funcionamiento de los medios de separación de fases líquidas en una realización particular de la presente invención, y

las figuras 6 y 6(a) son vistas parciales, en planta y en alzado lateral, del aparato adecuado para ser utilizado en una realización adicional de la presente invención.

Un método de acuerdo con una realización particular de la presente invención para ensayar una multiplicidad de muestras líquidas, comprende (i) hacer reaccionar por lo menos dos materiales líquidos en una multiplicidad de cavidades, (ii) disponer medios de separación de fases

26 FEB 97

líquidas en comunicación con dichas cavidades, (iii) someter las cavidades y los medios de separación de fases líquidas a una fuerza centrífuga suficiente para transferir el contenido líquido de las cavidades a los medios de separación de fases líquidas comunicantes y para permitir la separación del líquido transferido a estos en dos fases por lo menos y (iv) medir por lo menos una propiedad de una fase separada.

La presente invención se entenderá más completamente, con referencia a los dibujos, en los que la figura 1 muestra un aparato adecuado para ser utilizado en la práctica de la presente invención, que comprende un miembro de soporte 15 rotatorio fijado al eje 20 destinado a ser accionado por el motor 30 que está acoplado al eje 20 como se indica en 18 en un margen de velocidades. Los miembros anteriormente mencionados están soportados por la placa de base 40 y encerrados dentro de una envolvente 50, que está provista de una tapa 60 que puede ser retirada. El anillo 70 está unido de manera separable al miembro rotatorio 15 y es portador de una multiplicidad de tubos separables 65, que están engranados con el anillo 70 por medio de disposiciones 80 de asiento de rótula, tales que los tubos se pueden mover libremente desde la posición de reposo 90 hasta la posición de rotación 100 por rotación adecuada del miembro 15. El disco 110 está montado de manera separable sobre el miembro 15 y en coincidencia sobre él por medio del pasador 112, de tal manera que, con referen

cia a la figura 2, cada fila 120 de cavidades 130 y 140 radialmente alineadas, están en alineación substancial con un tubo 65. Los tubos 65 están ligeramente desplazados desde la alineación radial exacta con las cavidades 130 y 140 opuestas, para compensar la inercia del líquido durante la transferencia a los tubos 65, pudiendo ser determinado y ajustado rutinariamente este desplazamiento para un aparato dado.

A título de descripción general, en la práctica de la presente invención, por ejemplo con el fin de obtener la concentración de una sustancia en muestras de suero o de sustancias similares al suero, una cantidad precisa de reactivo 150 se dispone en las cavidades 130 y una cantidad precisa de suero 160 se dispone en las cavidades 140, siendo el reactivo tal que reaccione con la sustancia de la muestra, cuya concentración se busca, para producir un producto de reacción físicamente separable. Las cavidades 130 y 140 pueden ser, por lo tanto, cargas mediante pipeteado manual o mediante el uso del aparato descrito en la patente de Estados Unidos número 3.801.283, de S. Shapiro y T. Picunko, expedida el 2 de Abril de 1974. El motor 30 se acelera hasta una primera velocidad, de tal modo que la fuerza centrífuga desarrollada provoque que el reactivo 150 de las cavidades 130 sea transferido a las cavidades 140 y se mezcle y reaccione con las muestras 160 de las cavidades 140. La velocidad del motor 30 se regula

26 FEB

de tal modo que el contenido de las cavidades 140 no sea forzado a salir de las cavidades 140 por la fuerza centrífuga. El reactivo 150 y las muestras 160 reaccionan en las cavidades 140 y, con el tiempo, se forma en las cavidades 140 una cantidad creciente de producto de reacción y, finalmente, se produciría una condición de equilibrio y, al cabo de este tiempo, se podría efectuar un análisis del contenido de las cavidades 140, para determinar mediante técnicas conocidas la concentración de la substancia existente en las muestras160. Tal práctica sería, sin embargo, tediosa en el mejor caso y exigiría un prolongado periodo de tiempo, hasta de una hora o más para muchas aplicaciones. En la práctica de la presente invención, sin embargo, no es necesario que la reacción en las cavidades 140 transcurra hasta el equilibrio, sino solamente que se produzca en las cavidades 140 una cantidad mensurable de producto de reacción o que varíen las cantidades de los reaccionantes, tras lo cual se aumenta la velocidad del motor 30 hasta aquélla para la que el contenido de las cavidades 140 es transferido por la fuerza centrífuga por los canales 700 a los dispositivos 190 de medios de separación de fases líquidas, que se muestran como columnas de gel cromatográfico 200 contenidas en envolventes 210 de vidrio abiertas por la parte superior, que están asentadas de manera separable en los tubos 65. El material líquido

en contacto con las columnas de gel 200 se separa cromatográficamente en ellas por aplicación a ellas de un eluyente. Esto se efectúa con el aparato de la figura 1, distribuyendo una corriente de un líquido adecuado, por ejemplo una solución tampón, desde el depósito 222, por medio de la bomba 220 de eluyente, a través del conducto 230 y del distribuidor 240, en las cavidades 130, inmediatamente después de que los contenidos 160 de las cavidades 140 son transferidos a las columnas de gel 200. Con referencia a la figura 1, la bomba 220 es accionado por medio de una disposición reguladora de tiempo 212 convencional en un momento conveniente, por ejemplo 15 segundos, después de que se ha alcanzado la segunda velocidad más rápida. La bomba 220 proporciona un caudal fijo de eluyente durante un periodo de tiempo fijo y la cantidad total de eluyente es automáticamente dividida entre las cavidades 130. El eluyente es transferido a las columnas de gel 200 mediante la fuerza centrífuga, pasando por las cavidades 130 y 140. Al transferir eluyente a las columnas de gel 200, la fuerza centrífuga provoca la separación cromatográfica de los constituyentes del líquido transferido desde las cavidades 140. Con una selección apropiada de la columna de gel 200, y con referencia al procedimiento ilustrativo expuesto aquí en lo que sigue, uno de los constituyentes de la reacción existente en el material de la co-

26 FEB 1976

lumna de gel puede ser separado rápidamente mediante elución y transferido por la fuerza centrífuga a través de las salidas 215 de la envolvente 210 a los tubos 65, como se muestra en 152. En el caso en que uno de los reaccionantes empleados sea radioactivo, cada uno de los tubos 65 se puede retirar del anillo 70, pudiéndose medir la radioactividad de su contenido 152, utilizando la disposición convencional de la figura 3, que comprende un detector de rayos gamma 230, por ejemplo, una combinación de tubo fotomultiplicador/cristal de yoduro de sodio, un amplificador 240, un analizador de altura de impulsos 245, un contador 250 y un dispositivo visualizador 260, por ejemplo, una impresora numérica o digital. Las señales así obtenidas para cada tubo 65 pueden ser relacionadas con la concentración existente en la muestra de la sustancia de interés, mediante cálculo o mediante comparación con un patrón.

Como se muestra en la realización particular de la figura 2(a), una cavidad 130 de la hilera interior comunica con la cavidad 140 de la hilera exterior, con la cual está alineada, mediante un medio de paso similar a una cubeta o depresión, indicado por 500, el cual está formado por las superficies laterales y por la superficie del fondo ascendente de una cavidad interior 130. Con una rotación y fuerza centrífuga suficientes, el líquido existente en la cavidad 130 rebosa por la parte elevada 800 a una cavidad

140 exterior y alineada con ella. Asimismo, una cavidad 140 de la hilera exterior comunica con un medio de separación de fases líquidas 190 (no mostrado en la Figura 2a), el cual está alineado con ella, mediante un medio alargado similar a una cubeta o depresión, indicado por 600, el cual está formado por las superficies laterales y la superficie de fondo ascendente de una cavidad exterior 140 y un canal 700. Con una rotación y fuerza centrífuga suficientes, el líquido existente en una cavidad exterior 140 rebosa y es transferido a un medio de separación alineado con ella. Sin embargo, la pendiente 145 de las cavidades exteriores 140 es más pronunciada que las pendientes 147 de las cavidades interiores 130 como se muestra en la Figura 1 de tal modo que el líquido quedará confinado en la cavidad exterior 140, formando la porción realzada 600 una barrera similar a un dique, hasta que se aplica una fuerza centrífuga aumentada que es mayor que la fuerza centrífuga requerida para hacer rebosar al líquido desde una cavidad interior 130 a una cavidad exterior 140.

En la práctica de la presente invención, como se há descrito anteriormente, es posible, teóricamente, para una reacción dada y para concentraciones particulares dadas de reaccionantes, calcular la concentración de un producto de reacción, o de un reaccionante, en un momento dado, después de iniciada la reacción, obteniéndo-

se una representación gráfica de concentración frente al tiempo, con respecto a la cual se pueden comparar las concentraciones medidas en momentos particulares. Para un caso sencillo el procedimiento puede ser el siguiente:

Para una reacción hipotética, bimolecular, irreversible, $A + B \longrightarrow C$, en la que se mezclan concentraciones iguales de A y B en el momento t = 0, y siendo en el momento t= 0 la concentración de C = 0, puede demostrarse que la concentración en cualquier momento posterior a t =), viene dada por:

$$C = \frac{Ao^2 K_1 t}{1 + AoK_1 t}$$

en la que:

Ao es la concentración inicial de los reaccionantes A y B.

$K_1 = A\ (-Ea/RT)$: ecuación de Arrhenius, en la que A es el factor de frecuencia, Ea es la energía de activación de la reacción, T es la temperatura de la reacción y R es la constante universal de los gases.

Con este cálculo y con una representación gráfica derivada de él, para la reacción dada, la concentración medida después de un tiempo de reacción relativamente corto, podría ser convertida rutinariamente en la con-

centración o nivel total de la sustancia de interés.

En una realización particular de la presente invención, se utiliza un patrón que evita el inconveniente del cálculo aproximado anteriormente descrito. En esta realización, con referencia a las figuras 1 y 2, un procedimiento general ilustrativo de esta realización consiste en colocar un anticuerpo, en calidad de uno de los reaccionantes, en las cavidades más interiores 130 del disco 110, colocando las muestras de suero que contienen una cantidad desconocida de una sustancia, por ejemplo tiroxina (T-4), juntamente con el reactivo T-4 radiactivo y con un reactivo de desplazamiento, en las cavidades exteriores 140. El disco se acelera rápidamente hasta una primera velocidad de rotación, en el curso de la cual se hace que el anticuerpo reaccionante se traslade desde las cavidades interiores 130, por la fuerza centrífuga, hasta las cavidades exteriores 140, en las cuáles se mezclan y reaccionan el anticuerpo y el T-4. En el curso de la reacción, el T-4 de las muestras de suero es desplazado de su portador y queda libre para competir con el reactivo T-4 marcado con isótopos radioactivos, por un número limitado de puntos de enlace sobre el anticuerpo reaccionante. En cualquier momento después del mezclado y durante el transcurso de la reacción en las cavidades 140, la proporción del reactivo T-4 marcado con isótopos radiactivos combinada con el anticuer-

18 D

po, respecto del reactivo T-4 marcado con isótopos radiactivos libre en las cavidades 140, proporciona una medida de la concentración inicial de reactivo T-4 en las muestras de suero. Por lo tanto, cuando la reacción ha transcurrido a la velocidad inicial durante un corto tiempo suficiente para proporcionar datos de señales radiactivas significativos y mucho antes de que se alcance el equilibrio de la reacción, se aumenta la rotación del disco 110 hasta un valor superior, para el cual los contenidos de las cavidades exteriores 140 son impulsados por la fuerza centrífuga a entrar en los medios de separación comunicantes 200, en donde se hace pasar el complejo de anticuerpo y reactivo T-4 (conteniendo tanto reactivo T-4 radiactivo, como no radiactivo), junto con el anticuerpo que no ha reaccionado, a través de los medios de separación 200 siendo absorbido por los medios de separación 200 el reactivo T-4 que no ha formado complejo (tanto radiactivo, como no radiactivo).

Este hecho detiene la reacción formadora de complejo, al eliminar por lo menos uno de los reaccionantes (el anticuerpo) del medio de reacción (columnas de gel 200) y, por consiguiente, una señal de la radiactividad del complejo separado de anticuerpo y reactivo T-4, comparada con un patrón, proporciona una medida del contenido inicial de reactivo T-4 de la muestra que se está ensayando. El pa-

trón puede ser preparado mediante el uso de suero o de materiales similares al suero, de concentraciones de reactivo T-4 conocidas, pero diferentes, y utilizando las mismas condiciones de reacción que para las muestras de ensayo anteriormente mencionadas, representando gráficamente las señales radiactivas (o proporción de señales) obtenidas para cada material frente a su concentración conocida de reactivo T-4. En una práctica preferida, los materiales "patrón" se colocan en cavidades apropiadas 140 en el mismo disco 110 utilizado para las muestras de ensayo de concentración de reactivo T-4 desconocida, obteniéndose concurrentemente los datos patrón y los datos de ensayo.

La figura 4, que está relacionada directamente con el ejemplo específico presentado aquí en lo que sigue, ilustra una gráfica patrón que puede obtenerse para ser utilizada de la manera precedente y que muestra las señales radiactivas por minuto obtenidas utilizando materiales de partida "patrón" que contienen una cantidad conocida de reactivo T-4. A título de ejemplo, la figura 4 indica, para las condiciones particulares empleadas, que cuando se obtiene una señal de 4.000 con una muestra de suero de ensayo que se ha hecho reaccionar concurrentemente con los materiales "patrón", la concentración inicial de reactivo T-4 en una muestra de suero es de 6,2 microgramos de

reactivo T-4 por cada 100 ml de muestra. Como es natural, se entiende que en la práctica de la presente invención se emplean cantidades de reaccionantes apropiadas y controladas con precisión, y que la presente invención es aplicable, generalmente, a todas las reacciones líquido-líquido, particularmente a aquellas empleadas en las técnicas de ensayos clínicos bien conocidas para el suero sanguíneo o para materiales similares al suero, utilizando reactivos conocidos en la técnica.

El método de la presente invención es particularmente aplicable para el ensayo de una amplia gama de moléculas fisiológicamente importantes, por ejemplo, como las descritas en la revista Clinical Chemistry, volumen 19, Nº 2, 1973 (artículo de D. S. Kelley, L. P. Brown y P.K. Besch, en la página 146).

El siguiente ejemplo ilustrará adicionalmente la presente invención.

EJEMPLO

Muestras de suero clínicas fueron analizadas para determinar la concentración de tiroxina (T-4) contenida en ellas, utilizando un aparato del tipo ilustrado en las figuras 1, 2, y 3, y una curva patrón como la mostrada en la figura 4. Nueve muestras clínicas de suero de concentración de T-4 desconocida, por duplicado, y cinco

soluciones "patrón", cada una de ellas de diferentes concentraciones de T-4, pero conocidas, por duplicado, fueron sometidas a ensayo simultáneamente. Este se efectuó cargando dos cavidades exteriores 140 del disco 110, con 35 microlitos cada una, de una muestra clínica particular de suero, cargando, por lo tanto, 18 cavidades exteriores designadas convenientemente en la figura 2 por 1, 1'; 2, 2'; 3, 3'; ..... 9, 9'. Asimismo, dos cavidades exteriores 140 del disco 110 fueron cargadas con 35 microlitos cada una, de una en particular de cinco soluciones "patrón", cargando, por lo tanto, 10 cavidades exteriores 140 designadas convenientemente en la figura 2 por a, a'; b, b'; ..... e, e'. Las concentraciones de T-4 en las soluciones "patrón" preparadas como se describe aquí en lo que sigue, fueron las siguientes:

Patrón	T-4 (microgramos/100 ml)
a	0
b	2
c	6
d	12
e	30

En el curso de la carga de las cavidades exteriores como se ha descrito anteriormente, cada una de las cantidades de 35 microlitos fue mezclada con 65 microlitos de agua

26 FEB. 1976

destilada. Adicionalmente, a cada una de las cavidades exteriores 140 cargada como se ha descrito anteriormente, se añadieron 50 microlitos de una solución radiactiva T-4-^{125}I (preparada como se describe en lo que sigue). Cada una de las cavidades interiores 10, 10'... 90, 90' y A, A'.... E,E' fueron cargadas con reactivo de anticuerpo (descrito en lo que sigue). El disco 110 cargado como se ha descrito anteriormente, se aceleró rápidamente en el aparato de la figura 1, hasta una primera velocidad tal que los contenidos de las cavidades interiores 10,10'.... 90,90' y A,A'.... E,E' fueron transferidos, en el espacio de unos 3 segundos, debido a la fuerza centrífuga, a las respectivas cavidades exteriores comunicantes 1, 1'.... 9, 9' y a, a'.... e, e', en las que comenzó la reacción y transcurrió durante 30 minutos.

$$T_4 + AB \rightleftharpoons AB \cdot T_4$$

$$T_4^R + AB \rightleftharpoons AB \cdot T_4^R$$

Una vez transcurridos treinta minutos, se aceleró rápidamente la velocidad de rotación del disco 110 hasta una segunda velocidad, y la fuerza centrífuga desarrollada provocó que los contenidos de las cavidades 1, 1' .... 9, 9' y a, a' ... e, e' fueran transferidos a las respectivas columnas cromatográficas comunicantes 200.

Quince segundos después de la aceleración del disco 110 hasta esta segunda velocidad, se puso en funcionamiento la bomba de eluyente mostrada como 220 en la figura 1, mediante una disposición reguladora de tiempo 212 convencional para distribuir 2 ml de solución tampón (descrita aquí en lo que sigue) desde el recipiente 222 a cada una de las cavidades interiores 130 por medio del distribuidor 240. Se proporciona un caudal total de 60 ml distribuyendo 30 ml por minuto durante 2 minutos, siendo "dividido" el caudal total por las treinta cavidades, en 2 ml por cavidad. La fuerza centrífuga hace que la solución así añadida por medio del distribuidor 240, sea transferida desde las cavidades 10, 10'.... 90, 90' y A, A'.... E, E' a las cavidades 1, 1'... 9, 9' y a, a'.... e, e' y a las respectivas columnas cromatográficas 200, en las que los reaccionantes y los productos de reacción son sometidos a una elución debida a la fuerza centrífuga desarrollada por la rotación que actúa sobre el eluyente y, como resultado, el complejo de anticuerpo y T-4 (que contiene tanto el T-4 radiactivo como el no radiactivo) junto con el anticuerpo que no ha reaccionado, son rápidamente eluidos, por ejemplo en el espacio de un minuto, desde las columnas cromatográficas individuales 200 y, a causa de la fuerza centrífuga, son impulsados a los tubos 65, como se indica en 152 en las figuras 1 y 2. La solu-

26 FEB 76

ción de T-4-^{125}I y los componentes del suero de bajo peso molecular permanecen en las columnas cromatográficas 200. En el presente ejemplo, por separación del anticuerpo mediante elución, la reacción anteriormente indicada se detiene esencialmente en el momento de la separación en cada una de las columna cromatográficas 200. En cualquier momento conveniente después de la elución, se trasladan los tubos 65 a una disposición del tipo mostrado en la figura 3, y cada tubo 65, con su contenido 152, se somete a recuento durante un minuto, como se muestra en la tabla siguiente.

18 DIC

TABLA

Tubo correspondiente a la posición		Señales/minuto	Microgramos % T_4	
a	0	7623	0	
a'	0'	7468	0	
b	1	5398	2	
b'	1'	5496	2	
c	2	3194	6	Concentraciones "patrón" representados gráficamente en la figura 4.
c'	2'	3307	6	
d	3	2235	12	
a'	3'	2325	12	
e	4	1299	30	
e'	4'	1336	30	
1	5	4544	4,7	
1'	5'	4408	5,1	
2	6	3009	8,9	
2'	6'	2956	9,0	
3	7	3919	6,4	
3'	7'	4051	6,1	
4	8	4092	6,0	
4'	8'	3899	6,4	Concentraciones desconocidas de las muestras clínicas, determinadas a partir de la gráfica de la figura 4.
5	9	3415	7,7	
5'	9'	3627	7,1	
6	10	4500	4,8	
6'	10'	4389	5,2	
7	11	4092	6,0	
7'	11'	3899	6,4	
8	12	3225	8,4	
8'	12'	3192	8,2	
9	13	3501	7,4	
9'	13'	4052	6,0	

18 DIC. 1975

Las concentraciones conocidas de T-4 en microgramos de T-4 por cada 100 ml de muestra de los patrones a, a'.... e, e', fueron representadas gráficamente frente a las señales obtenidas por minuto para obtener la gráfica de la figura 4, utilizando las señales medidas en la tabla correspondientes a las muestras. Las concentraciones determinadas en la tabla para las muestras clínicas se obtuvieron a partir de la gráfica de la figura 4. Lo que sigue es una descripción detallada de los materiales y procedimientos del ejemplo descrito anteriormente.

I.- Sustancia sometida a análisis.

Muestras clínicas de suero

II. Materiales utilizados.

1.- Tiroxina (reserva T-4), ácido libre : número de catálogo 2376, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.

2.- Tiroxina-^{125}I (T-4-^{125}): número de catálogo 6751 "Tetramet-125", Abbott Labs, North Chicago, Illinois.

3.- Suero antitiroxina (conejo) : Wien Labs., Succasunna, New Jersey.

4. Acido clorhídrico : número de catálogo A-144, Fisher Scientific, New York, New York.

5. Hidróxido sódico, 0,1 N : Número catálogo SO--S-276, Fisher Scientific.

6. Barbital sódico : número catálogo B-22, Fisher Scientific.

7. Azida sódica : número catálogo S-227, Fisher Scientific.

8. Suero de conejo normal.

9. Acido 8-anilin-1-naftalensulfónico, sal sódica (ANS) : número catálogo 9041, K&K Labs. Plainview, New York.

10. Plasma humano almacenado normal : Plasma Products.

11. Carbón vegetal activado : Darco G-60, Matheson, Coleman & Bell, Rutherford, New Jersey.

12. Sephadex G-25, fino (gel cromatográfico) : Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, N.J.

13. Columnas (para gel cromatográfico) : número de catálogo 102/2, Walter Sarstedt, Inc., Princeton, N.J.

14. Tubos : tubos de ensayo de 12 x 75 mm y de 17 x 100 mm.

III. Reactivos utilizados.

A. Acido clorhídrico 6 N, 1 litro.

B. Tampón de barbital, 0,075 M, pH 8,6; 1 litro.

Se disuelven 15,54 g de barbital sódico y 100 mg de azida sódica en 800 ml de agua destilada. Utilizando un medidor de pH normalizado, se lleva el pH de la solución a 8,6 mediante la adición, gota a gota, de HCl 6 N, mezclando el barbital a fondo en toda la masa. (Se necesitan aproximadamente 2 ml de HCl 6 N). Se completa hasta 1 litro

18 DIC 1974

con agua destilada. Este tampón es utilizable durante un mes, con refrigeración.

C. Tampón de barbital y suero de conejo normal al 2%, 100 ml

Se añaden 2 ml de suero de conejo normal a 98 ml de tampón de barbital, y se mezcla a fondo. Es utilizable durante 2 semanas con refrigeración.

D. Plasma humano exento de tiroxina, 20 ml

Se mezclan a fondo 3 g de carbón vegetal activado, con 20 ml de plasma humano almacenado, en un tubo de centrífuga cónico y desechable, de 50 ml, teniendo cuidado de que se humedezca todo el carbón vegetal. Se tapa la mezcla y se coloca en el refrigerador durante la noche. Al día siguiente, se centrifuga la mezcla a unas 8.000 revoluciones por minuto, durante 10 minutos. Seguidamente, utilizando una jeringa de 20 ml, provista de un soporte de filtro Millipore de 25 ml, con un adaptador de Swinnex, se filtra el líquido sobrenadante, sucesivamente con (1) papel de filtro, (2) un filtro de 0,45 micras, (3) un filtro de 0,22 micras. Se prepara semanalmente y se refrigera o, si se congela, es utilizable durante 3 meses, por lo menos.

E.- Preparación de patrones de tiroxina (T-4)

1. Reserva T-4 (0,6 mg/ml).

Se disuelven 6,00 mg de reserva T-4 en un volumen mínimo de hidróxido sódico 0,1 N. Se completa hasta 10 ml con agua destilada. Esta solución se distribuye en par-

tes alícuotas en diales de 0,2 ml y se almacena en congelación durante 3 meses.

2. Patrones "de trabajo"

Se preparan tubos de ensayo de 12 x 75 mm y se etiquetan del 1 al 5. Se preparan los patrones de trabajo T-4 de acuerdo con el esquema siguiente:

Tubo Nº	Adición de tampón de barbital	Eliminación del tampón	Adición de reserva T-4	Concentración final
1	1,0 ml	0 microlitros	0 microlitros	0 microgramos/ml
2	1,0 ml	10 microlitros	10 microlitros de reserva T-4 diluida a 3 veces su volumen	2 microgramos/ml
3	1,0 ml	10 microlitros	10 microlitros	6 microgramos/ml
4	1,0 ml	20 microlitros	20 microlitros	12 microgramos/ml
5	1,0 ml	50 microlitros	50 microlitros	30 microlitros/ml

3.- Patrones reales utilizados.

Se etiquetan del 1 al 5, cinco tubos de ensayo de 17 x 100 mm; se añaden 0,5 ml de plasma exento de T-4 a cada uno de ellos. Se retiran 50 microlitros del correspondiente patrón "de trabajo" mostrado anteriormente. Se

mezcla a fondo. Los resultados finales serán:

Tubo Nº		T-4 nanogramos/ml	T-4 nanogramos/35 microlitros	T-4 nanogramos/100 ml
1	a	0	0	0
2	b	20	0,7	2
3	c	60	2,1	6
4	d	120	4,2	12
5	e	300	10,5	30

Congelar en partes alícuotas de 0,5 ml.

F. Solución de tiroxina I^{125}

1.- Solución de ANS

Se disuelven 60 mg de ácido 8-anilin-1-naftalen sulfónico en 10 ml de reactivo C.

2. Solución de isótopo

Una calidad mínima de Tetramet-125 es 500 microcuries. La solución es utilizable durante 6 semanas, La fecha de expiración viene dada en la etiqueta de los laboratorios Abbott. La actividad, es decir, los microcuries por mililitro, variará de lote a lote; esta es también indicada para cada lote en la etiqueta. En 50 microlitros han de añadirse a cada tubo 14.000 señales por minuto (cpm); las 14.000 cpm corresponden aproximadamente a 0,014 microcuries. Se determina el número total de tubos de ensayo, patrones y muestras desconocidas, se aumenta en un 10% como factor de seguridad, y se multiplica el número final por 0,014; esto

es el número total de microcuries necesario. Seguidamente, se multiplica el número total de tubos, incluido el 10% extra, por 50. Esto es el número total de mililitros de ANS necesarios. Se retira el número de microlitros de Tetramet-125 correspondiente al número de microcuries y se completa hasta el volumen correcto de ANS.

Se prepara el día en que se va a utilizar.

G.- Reactivo de anticuerpo.

El anticuerpo procede del Wien Labs, liofilizado en viales etiquetados como "100 Test". Cada vial se reconstituye con 14,0 ml de reactivo C. Es utilizable durante 2 semanas, con refrigeración.

IV. Informe.

A. Condiciones de reacción:

Se mezclan entre sí 50 microlitos de solución T-4-^{125}I, 35 microlitros de patrón o de muestra de suero, y 65 microlitros de agua de reposición destilada.

Se añaden, seguidamente, 200 microlitros de reactivo de anticuerpo. Se deja que la reacción transcurra durante 30 minutos a la temperatura ambiente y a la primera velocidad del incubador/separador y, cuando la velocidad se aumenta hasta el segundo nivel, se transfiere el volumen de reacción total a una columna de Sephadex G-25, fino. El complejo se somete a elución con 2,0 ml de tampón de barbital. El complejo se somete a conteo duran-

18 DIC 1975

te 1 minuto en un contador de rayos gamma.

Cada una de las muestras y de los patrones se somete a ensayo por duplicado. Los patrones del 1 al 5 ocupan 10 posiciones.

B. Tratamiento de los datos.

Los patrones se representan gráficamente de la manera siguiente: señales por minuto sobre el eje de las y frente al log. de microgramos/100 ml sobre el eje de las x. Los patrones, tal como se han preparado anteriormente, son: 0, 2, 6, 12, 30 microgramos de tiroxina por 100 ml. Las muestras desconocidas se determinan a partir de la curva patrón, encontrando el valor de los microgramos de tiroxina por cada 100 ml, que corresponde a las señales de la muestra desconocida.

V. Sustancia a analizar.

Muestras clínicas de suero.

En la realización de la presente invención ilustrada mediante el precedente ejemplo específico, se obtienen ventajas particulares, deteniendo esencialmente la reacción formadora del complejo descrita, por separación rápida de los constituyentes de los medios de reacción, en condiciones controladas, en las columnas cromatográficas 200. Para considerar un caso general, en el que los reaccionantes designados por A y B se colocan en las cavidades interiores y exteriores 130 y 140, respectivamente, y se hace que se mezclen y que la reacción transcurra

18 DIC

en las cavidades exteriores para producir cantidades crecientes de un producto de reacción C, la reacción que produce el compuesto C se detiene esencialmente en las columnas cromatográficas recolectoras por separación de la mezcla de A, B y C en las columnas cromatográficas 200, en sus fases, una de las cuales se recoge en los tubos 65 y contiene por lo menos un reaccionante, por ejemplo bien sea A o B, y, aún cuando continúe la rotación, no se producirá más cantidad de C, ni, por lo tanto, será eluida, y el parámetro de la fase eluida que ha de ser medida, por ejemplo la radiactividad, el color, la fluorescencia, la designación del enzima, se "fija" al mismo tiempo esencialmente para todas las muestras que están siendo analizadas. Esta realización es particularmente ventajosa en aplicaciones tales como los ensayos cinéticos que implican la determinación en una muestra de hormonas tiroideas, hormonas sexuales, glicósidos cardíacos, vitaminas, antígenos del cáncer, utilizando reactivos patrón para ensayos de radioinmunidad.

Lo que antecede se entenderá más completamente con referencia a la figura 5(a), la cual representa, esquemáticamente, un punto en el momento en que la porción que no ha reaccionado de los reaccionantes A y B y el producto de reacción C, han sido transferidos al gel cromatográfico 200', pero antes de transferir el elu

26 FEB 1976

yente al gel cromatográfico 200'. En estas condiciones A y B pueden continuar reaccionando y produciendo cantidades adicionales de C. Sin embargo, al transferir eluyente al gel cromatográfico 200', que se selecciona en este caso para que separe el reaccionante B junto con el producto de reacción C, se separan rápidamente B y C de A, en una fase que se desplaza a lo largo del gel cromatográfico 200', como se indica en la figura 5(b), deteniéndose así la formación de producto de reacción adicional C. La fase 152' que comprende las proporciones fijas de B y C se transfiere mediante la fuerza centrífuga, al tubo 65' como se indica en la figura 5 (c), y el valor fijado del parámetro de interés, bien sea de B o de C, puede medirse en debida forma.

En otras aplicaciones que implica el procedimiento de la presente invención, en las que no es de importancia esencial detener la reacción en el gel cromatográfico 200, estando todas las muestras y los patrones sometidos esencialmente a las mismas condiciones de reacción y de separación, el gel cromatográfico puede ser seleccionado de tal manera que eluya y separe el producto de reacción de los reaccionantes, particularmente en los casos en los que cualquier formación adicional de producto de reacción en el gel, y la elución del mismo, será compensada utilizando un patrón sometido a un tratamiento simultáneo.

En la práctica de la presente invención, el parámetro de interés puede ser la radiactividad, como se ha descrito en particular en lo que antecede, el color, la fluorescencia o cualquier otra propiedad física o química adecuada. Por consiguiente, en lugar de una disposición de contador de radioactividad, se pueden utilizar también otros dispositivos detectores convencionales conocidos en la técnica.

En una realización adicional de la presente invención, con referencia a la figura 6, se emplea un disco 510, que tiene una pluralidad de cavidades individuales 520, en lugar de un par de cavidades alineadas radialmente 130 y 140, como en el dispositivo de la figura 1. En la práctica de la invención que utiliza el aparato de la figura 6, se colocan en las cavidades 520 cantidades precisas de dos o más reaccionantes, por ejemplo suero y reactivo indicados por 525, cavidades en las que tiene lugar una reacción para proporcionar un producto de reacción físicamente separable. La carga de las cavidades 520 puede ser efectuada pipeteando, como se ha descrito anteriormente. Una o más de las cavidades 520 pueden ser cargadas con reaccionantes patrón, de la manera anteriormente descrita, y el disco 510 así cargado, puede ser colocado sobre el miembro de soporte 15 de la misma manera que el disco 110 de la figura 1, y hecho girar a una velocidad suficiente para hacer que los contenidos de las cavidades 520 sean transferidos por la fuerza centrífuga a los medios de so-

18 DIC 19

paración comunicantes 190. A partir de este momento, el procedimiento transcurre de la misma manera que se ha descrito anteriormente en relación con la disposición de aparato de la figura 1 y un patrón, como se ilustra en la figura 4. En la práctica de la realización precedente, el disco 510 que contiene cavidades 520, puede ser cargado con reaccionantes, permitiendo que la reacción transcurra hasta el equilibrio. Es decir, los discos 510 pueden ser cargados y guardados durante prolongados periodos de tiempo, por ejemplo durante horas o más, después de lo cual los discos 510 pueden ser dispuestos en lugar de los discos 110 en el dispositivo de la figura 1, efectuándose un ensayo como se ha descrito anteriormente. Esta realización puede ser empleada eficazmente con reacciones lentas, por ejemplo, la determinación de la hormona del crecimiento humano en el suero de la sangre, las cuales, si se utiliza la realización de doble cavidad anteriormente descrita, entrañarían una rotación impracticablemente larga, a las velocidades más altas, de, por ejemplo, una hora o más. Alternativamente, si los discos 510 se cargan en un periodo de tiempo tal que para la reacción lenta particular implicada, puede considerarse en la práctica que las reacciones en las diferentes cavidades únicas han empezado todas al mismo tiempo, el disco 510 cargado puede ser hecho girar y los contenidos de las cavidades 520 ser

transferidos a los medios de separación comunicantes 190, en cualquier momento en que se haya producido en las cavidades 520 una cantidad mensurable de constituyente separable. Este procedimiento es eficaz en los casos en que cualquier pérdida de exactitud del ensayo que pudiera resultar de los diferentes tiempos de reacción en las diversas cavidades, no sea importante en comparación con el tiempo que se ahorra.

Entre las ventajas particulares del método en tandem mecánica y químicamente continuo de la presente invención, se incluyen la eliminación esencial de intervención manual o mecánica en el curso de la realización de un ensayo, lo que hace mínima la importancia de variables distintas de las que son interesantes, y la posibilidad de utilizar tiempos de reacción cortos y de permitir estudios cinéticos simúltáneos en condiciones de tiempo controladas.

Para los fines de la presente invención, los constituyentes reactivos incluyen sustancias que reaccionarán químicamente para proporcionar un producto de reacción químicamente diferente o productos y, también, sustancias, que se pueden considerar que reaccionan físicamente (por ejemplo, ciertos fenómenos de adsorción física) para producir uno o más materiales físicamente diferentes.

El medio de separación de fases líquidas en la práctica de la presente invención, puede ser disposiciones cromatográficas convencionales, por ejemplo, que proporcionan una separación sobre la base del tamaño molecular, de los fenómenos de adsorción física, de la quimisorción, de las propiedades de intercambio de iones, de las afinidades moleculares específicas (cromatografía de afinidad) y de otras técnicas conocidas que utilizan, por ejemplo, geles, sólidos y resinas.

La presente solicitud, que corresponde a la presentada en Estados Unidos de América, el 10 de Mayo de 1974, bajo el Nº 468.649, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Pa-

tente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

1ª.- Aparato de ensayo para analizar una pluralidad de muestras líquidas, que comprende un disco giratorio con una pluralidad de cavidades que giran junto con dicho disco y dispuestas radialmente a cierta distancia para recibir muestras líquidas a analizar y al menos un reaccionante líquido, y con recipientes en dicho disco en alineación radial sustancial con cada una de dichas cavidades, caracterizado porque dichos recipientes están provistos de medios separadores de fases líquidas.

2ª.- Aparato según la reivindicación 1ª, caracterizado porque los medios separadores de fases líquidas son de forma de columna.

3ª.- Aparato según la reivindicación 2ª, caracterizado porque los medios separadores de fases líquidas son intercambiables y están dispuestos concéntricamente en dichos recipientes.

4ª.- Aparato según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 3ª, caracterizado porque dichos recipientes están diseñados en forma de tubos cerrados por el fondo.

5ª.- Aparato según la reivindicación 4ª, caracterizado porque dichos tubos que contienen dichos medios separadores de fases líquidas en forma de columna están soportados en sus partes extremas junto al disco por medio de

una junta pivotable para alineación radial sustancial con dichas cavidades por fuerza centrífuga, de modo que, cuando dicho disco está en posición de reposo, dichos tubos están verticalmente suspendidos.

6ª.- Aparato según la reivindicación 5ª, caracterizado porque dichos medios separadores de fases líquidas en forma de columna están provistos de una abertura para la salida de la fase líquida separada que se ha de precipitar en el fondo de dichos tubos.

7ª.- Aparato según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 6ª, caracterizado porque cada uno de dichos medios separadores de fases líquidas comprende solamente una cavidad en dicho disco.

8ª.- Aparato según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 6ª, caracterizado porque cada uno de los medios separadores de fases líquidas comprende dos cavidades radialmente dispuestas en comunicación en tandem en dicho disco.

9ª.- Aparato según la reivindicación 8ª, caracterizado porque la pendiente hacia arriba y hacia afuera entre la cavidad interior y la cavidad exterior es menos pronunciada que la pendiente entre la cavidad exterior y los medios separadores de fases líquidas.

10ª.- Aparato según las reivindicaciones 8ª o 9ª, caracterizado porque la sección transversal de flujo

de un paso de forma de cubeta entre la cavidad interior y la cavidad exterior es mayor que la sección transversal de flujo entre la cavidad exterior y los medios separadores de fases líquidas.

11ª.- Aparato según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 10ª, caracterizado porque comprende unos medios de admisión de eluyente para las partes extremas radialmente interiores de las cavidades.

12ª.- Aparato según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 11ª, caracterizado porque los medios separadores de fases líquidas son columnas de gel.

13ª.- Aparato de ensayo para analizar una pluralidad de muestras líquidas.

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.

Esta Memoria consta de treinta y cinco hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 12.[illegible]1977

P.A. Oscar de Elzaburu
Por Poder

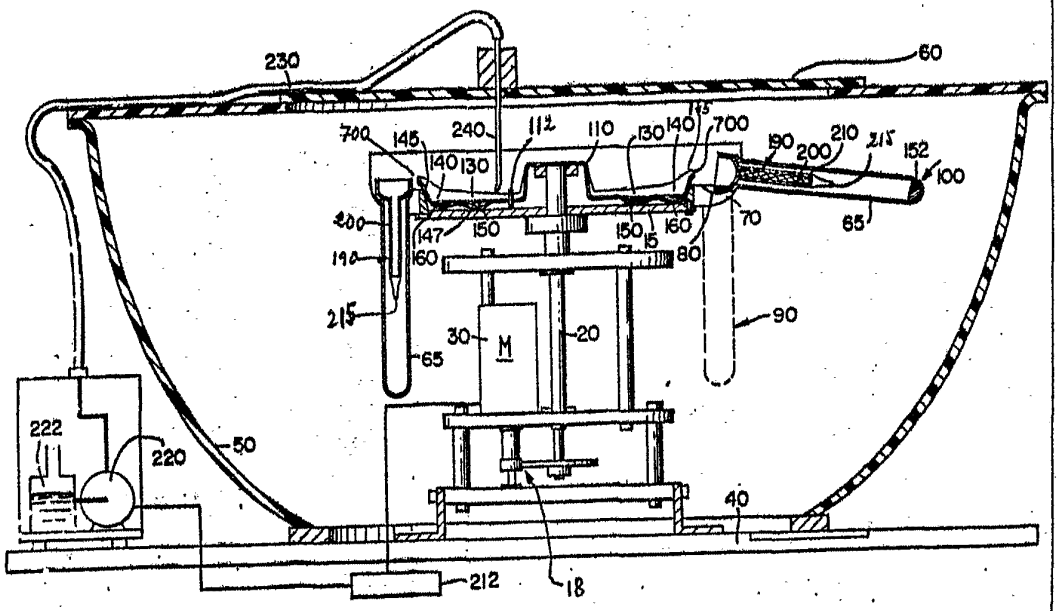
5-4-77
VGD.

UNION CARBIDE CORPORATION

I/V

26 FEB 1976

F I G. 1



Oscar de Elzaburu
Por Poder.

FIG. 2

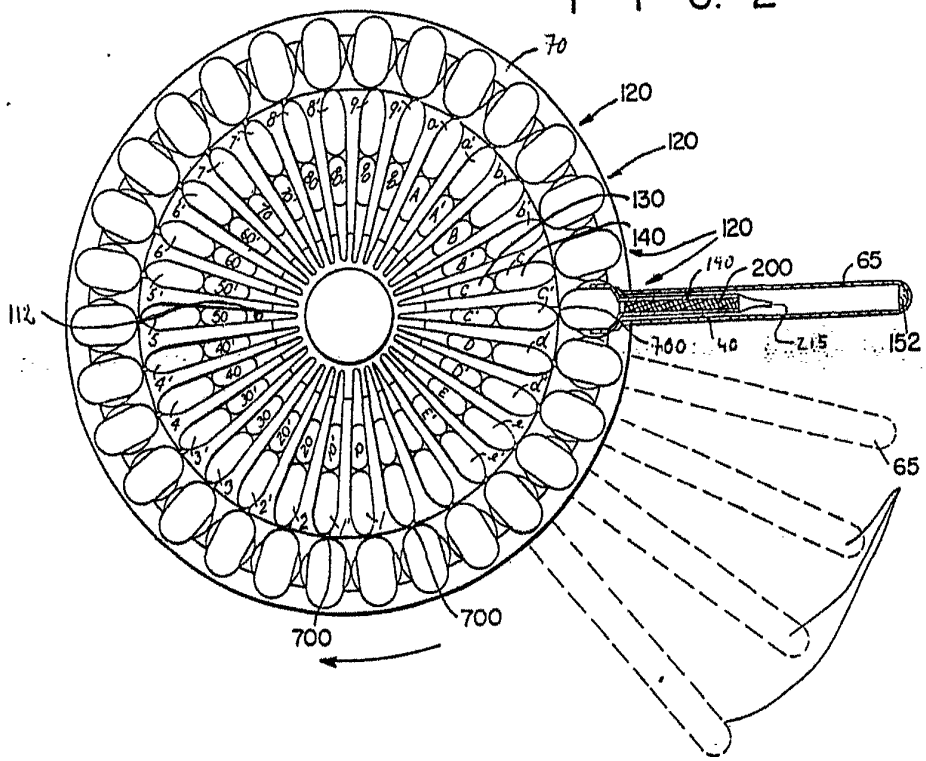
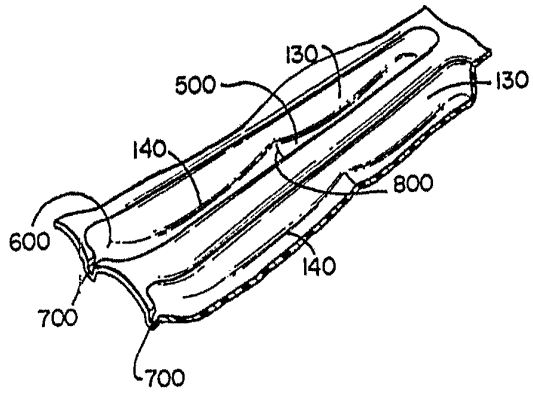


FIG. 2a



Oscar de Elzaburu
Por Poder

26 FEB. 1976

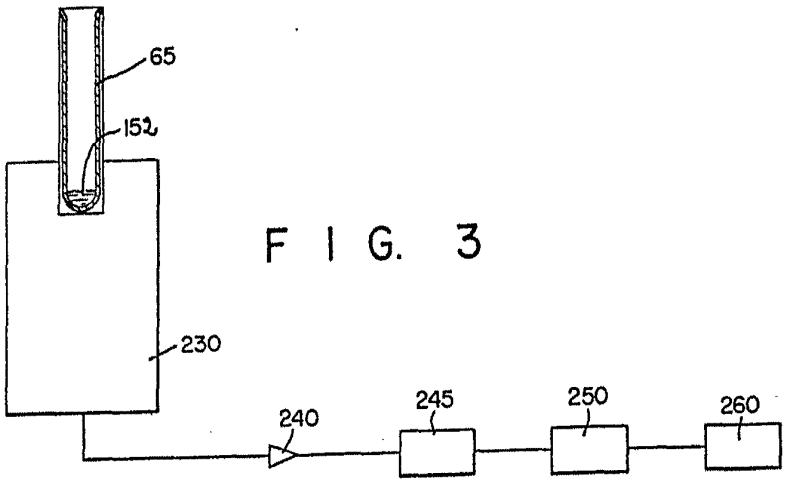


FIG. 3

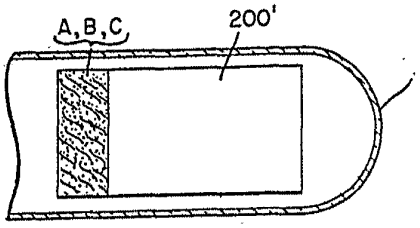


FIG. 5a

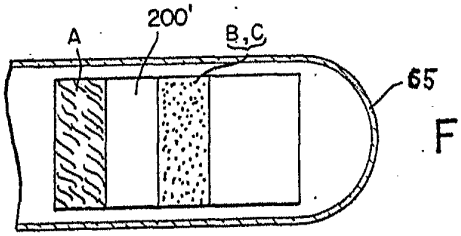


FIG. 5b

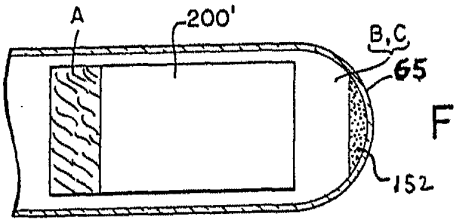
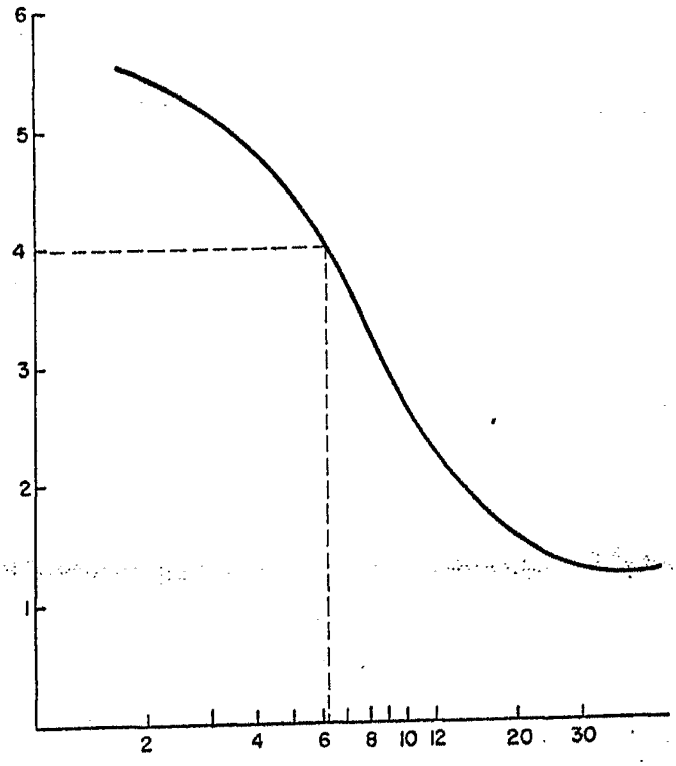


FIG. 5c

Oscar de Elzaburu
Por Poder

26 FEB 1975

FIG. 4



Oscar de Elzaburu
Por Poder.

FIG. 6

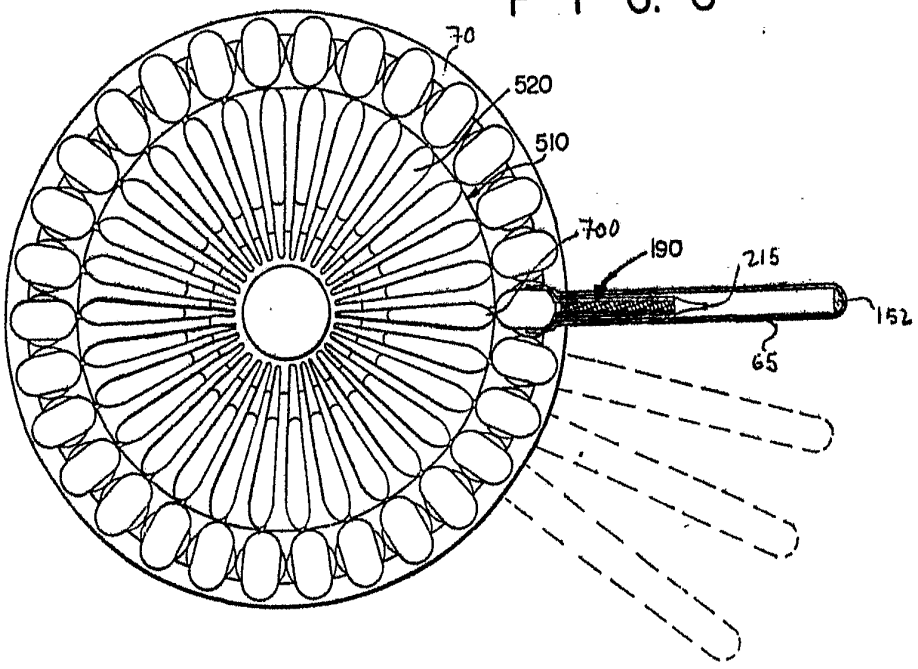
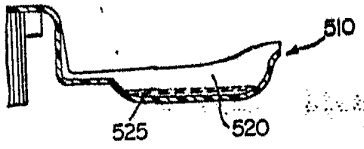


FIG. 6a



Oscar de Elzaburu
Por Poder