



ES 444543 A1
FECHA DE PRESENTACION
22-1-1976

PATENTE DE INVENCION

40 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
545.066	29-1-75	E.U.A.
555.908	6-3-75	E.U.A.
615.024	19-9-75	E.U.A.

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL G01M	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
-------------------------------	---	---

54 TITULO DE LA INVENCION "METODO DE DETERMINACION INMUNOLOGICA"
--

71 SOLICITANTE (S) BAXTER LABORATORIES, INC.
DOMICILIO DEL SOLICITANTE One Baxter Parkway, Deerfield, Illinois 60015, Estados Unidos de America
72 INVENTOR (ES) Eugene Achter, Jerome Kremen, Rodolfo Rodriguez, Paul Priarone y Carlton Deaton.
73 TITULAR (ES)
74 REPRESENTANTE DON FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ



La presente invención se refiere en términos generales a un reactivo inmunológico capaz de reforzar la magnitud de una reacción de inmunoprecipitación. Más específicamente, la invención se refiere a una solución de reactivo inmunológico que se puede utilizar en amplia variedad de métodos de determinación inmunológica.

La invención se refiere también a métodos de determinación inmunológica, en particular aquéllos que implican una reacción de un anticuerpo con un antígeno para formar un complejo de anticuerpo-antígeno, cuya insolubilización aumenta sustancialmente por utilización del reactivo de la presente invención en el método de determinación.

Hay numerosos métodos de determinación inmunológica, de metodología ampliamente variable, que necesitan en una u otra etapa de la determinación, y con fines variables, la insolubilización de tanto complejo de antígeno-anticuerpo como sea posible. Por ejemplo, la insolubilización del complejo juega un papel importante en técnicas de determinación inmunológica usuales importantes ilustrativas tales como el análisis electroforético, determinaciones enzimáticas, determinaciones radioinmunológicas (DRI) y determinaciones nefelométricas, y se ha orientado mucho trabajo hacia el desarrollo de medios para aumentar la insolubilización del complejo, para perfeccionar esas determinaciones. Normalmente se necesita la insolubilización del



complejo para aislar el producto de la reacción inmunológica, de los reaccionantes inmunológicos sin reaccionar implicados en una determinación concreta, de manera que el producto de reacción aislado, o los reaccionantes sin reaccionar, se puedan analizar por separado para proporcionar una determinación de diagnóstico significativa.

Para un método de determinación inmunológica que implique, por ejemplo, un análisis nefelométrico, se conoce diluir muestras de ensayo con una solución de polímero de polietilenglicol, antes de tanto la incubación de la muestra como de hacer una lectura en el instrumento nefelométrico. Aunque el polietilenglicol perfecciona el análisis nefelométrico aumentando la concentración de partículas suspendidas, mejorando así el análisis, permanece de todas formas el problema de que no se pueden hacer análisis satisfactorios de muchos constituyentes biológicos a causa de un intervalo o sensibilidad de ensayo inadecuados, debido a una concentración insuficiente de partículas suspendidas en la muestra de ensayo. El objeto amplio de la presente invención es resolver el problema anterior proporcionando un reactivo inmunológico perfeccionado que es eficaz para aumentar mucho la insolubilización de complejos anticuerpo-antígeno, más allá de la que se puede obtener con polietilenglicol solo, y aumentar por tanto la concentración de partículas suspendidas



en la muestra de ensayo, para permitir análisis de consti
tuyentes biológicos que no son posibles con polietilengli
col solo, ya se usen métodos de determinación nefelométri
cos u otros.

5 Más específicamente, según la invención se proporcio
na un reactivo inmunológico de una solución de al menos
un polietilenglicol, caracterizado porque el reactivo com
prende una solución acuosa de una mezcla de dicho polieti
lenglicol y un tensioactivo no iónico, conteniendo dicha
10 solución acuosa, en el uso, aproximadamente 3% a 6% en pe
so de la mezcla, y teniendo dentro de tal intervalo un va
lor calculado del EHL (equilibrio hidrófilo-lipófilo) com
prendido entre aproximadamente 0,7 y 1,7. Significativa
mente, la solución acuosa, cuando no está "en uso", tal
15 como por ejemplo en un método de determinación inmunológi
ca, puede tener una concentración de mezcla que sea menor
que 3% y mayor que 6%, y ser de todas formas útil para el
fin de la invención, siempre que la concentración de la
mezcla antes o en el momento de estar "en uso" se ajuste
20 para que tenga una concentración comprendida entre aproxi
madamente 3% y 6%. Por tanto, por el término "en uso",
tal como se utiliza en las reivindicaciones adjuntas, se
tiene la intención de cubrir un reactivo cuya concentra
ción de mezcla no necesita estar comprendida necesariamen
25 te entre aproximadamente 3% y 6%, siempre que el interva-



lo de concentración, si está fuera del intervalo especificado de 3% a 6%, se ajuste a esos límites durante o antes de un método de determinación.

5 También se proporciona según la invención un método de determinación inmunológica que implica una reacción entre un anticuerpo y un antígeno, para formar un complejo de anticuerpo-antígeno, estando caracterizado el método por utilizar en él el reactivo de la invención, para aumentar sustancialmente la magnitud de la insolubilización del complejo de anticuerpo-antígeno formado por dicha reacción.

10 Ventajosamente, el reactivo se puede introducir en el medio de ensayo para efectuar una determinación nefelométrica, enzimática, electroforética o radioinmunológica.

15 Cuando se efectúa un método de determinación nefelométrica, por ejemplo, para analizar constituyentes biológicos en forma de complejos de anticuerpo-antígeno, el reactivo y las partículas suspendidas de los constituyentes biológicos se incuban primero, tras lo cual se efectúa el análisis nefelométrico. Según este método se hace pasar una fuente de luz a través de una muestra de ensayo líquida, con lo que se dirigen los rayos de luz a través de las partículas suspendidas. A medida que esos rayos de luz chocan con las partículas son dispersados o difundidos



según cualquier ángulo previamente determinado, por ejemplo un ángulo recto, desde la fuente, y son recibidos por células fotoeléctricas. Esta luz dispersada se convierte en señal eléctrica que es directamente proporcional a la cantidad de concentración de partículas, que a su vez se mide así con exactitud en el cuadro de medida de un instrumento.

Son ejemplos de instrumentos adecuados para análisis nefelométricos el nefelómetro de laser PDQTM de Hyland (Hyland Laboratories), el fluorocolorímetro Aminco (American Instrument Company), el espectrofotofluorómetro (SPF) Aminco-Bowman, y el Auto Analyzer II con fluoronefelómetro incorporado (Technicon Instruments Corporation).

Mediante estos principios y equipo nefelométricos, el tecnólogo clínico puede hacer una determinación exacta de pequeñas concentraciones de una amplia variedad de proteínas específicas, por ejemplo las inmunoglobulinas IgG, IgA, IgM, transferrina, complemento C3, haptoglobina, alfa₁-antitripsina, β -lipoproteína, albúmina, alfa₂-macroglobulina, alfa₁-ácido glicoproteico, y otros diversos constituyentes biológicos tales como triglicéridos, lipoproteínas y gonadotropinas coriónicas humanas.

Las ventajas más importantes que resultan del uso del reactivo según la invención son: (a) se reducen significativamente los tiempos de incubación, y (b) se obtienen mayo



-6-

res concentraciones de partículas de complejo insolubiliza
do, en un tiempo de incubación más corto, con los resultan
tes intervalo de ensayo y sensibilidad perfeccionados. Es
tas ventajas son aplicables a cualquier método de determi
5 nación inmunológica que se vea beneficiado por una insolu
bilización reforzada del complejo de antígeno-anticuerpo
en algún momento durante la determinación. Las ventajas
son también aplicables a métodos de determinación inmunoló
gica que se basan en una etapa de insolubilización de com
10 plejo de antígeno-anticuerpo en algún momento durante el
método de determinación.

Como se ha indicado antes, la solución acuosa de reac
tivo, además de contener, en uso, aproximadamente 3% a 6%
en peso de la mezcla de polietilenglicol y tensioactivo
15 no iónico, debe tener también un valor calculado del EHL
entre aproximadamente 0,7 y 1,7.

El valor del EHL es una medida bien establecida del
equilibrio hidrófilo-lipófilo (de ahí "EHL") de un tensio
activo dado. El sistema EHL de identificación de un ten
20 sioactivo fué desarrollado por Atlas Chemical Industries,
Inc., y está descrito en detalle en las págs. 28-36 de
la publicación de Atlas titulada "Guide to the Use of At
las Surfactants and Sorbitol in Cosmetic and Pharmaceuti
cal Products" (Guía para el uso de los tensioactivos At
25 las y sorbita en productos cosméticos y farmacéuticos)



(1965), incorporándose aquí dicha publicación por esta referencia a la misma. A cada tensioactivo se le asigna un número de EHL. Cuanto menor sea el número de EHL más lipófilo (o afín para el aceite) es el tensioactivo, mientras que cuanto mayor sea el número más hidrófilo (o afín para el agua) es el tensioactivo. El método para establecer el valor de EHL de cualquier tensioactivo dado es bien conocido, y está descrito, por ejemplo, en una publicación impresa por Atlas y distribuída públicamente, titulada "The Atlas HLB System" (El sistema EHL de Atlas) (Código ID-97). Los valores de EHL de numerosos tensioactivos también están ampliamente publicados en la bibliografía, particularmente en la bibliografía emanada del fabricante del tensioactivo en cuestión.

El valor de EHL de una mezcla de tensioactivos, tal como la que existe en el reactivo de esta invención, es función de la concentración de cada tensioactivo en la mezcla, y por tanto se ha de tener en cuenta la concentración de los tensioactivos individuales al calcular el valor de EHL para la mezcla. El valor de EHL de la mezcla se calcula, según métodos publicados aceptados, multiplicando el valor de EHL asignado a cada tensioactivo presente en la mezcla por su concentración en la composición en cuestión, y sumando los resultados individuales calculados. Por ejemplo, si el reactivo de la invención conte-



nía 1% en peso de polietilenglicol (EHL = 20) y 3% en peso de un tensioactivo no iónico que tiene un EHL de 30,5, el valor de EHL del reactivo se calcularía como sigue:

$$\begin{array}{rcl}
 & 0,01 \times 20 & = 0,2 \\
 5 & 0,03 \times 30,5 & = \underline{0,915} \\
 & & 1,115 \text{ -- valor de EHL del reactivo.}
 \end{array}$$

10 Para determinar si un reactivo dado tiene un valor EHL que caiga dentro del intervalo de 0,7 a 1,7 del reactivo de esta invención se puede hacer fácilmente un cálculo como antes, basado en la cantidad de cada componente en la mezcla, usando valores de EHL publicados para los componentes en cuestión, o valores de EHL determinados según el método de Atlas.

15 La presente invención contempla el uso de una amplia variedad de tensioactivos no iónicos conjuntamente con el polietilenglicol, siempre que: (1) la mezcla de tensioactivo no iónico y polietilenglicol caiga dentro de un intervalo de 3 a 6% en peso en el momento en que se use el
 20 reactivo en la determinación, y (2) que el valor calculado de EHL para el reactivo caiga dentro de un intervalo de 0,7 a 1,7 en el mismo momento. Si en el momento del uso la mezcla de polietilenglicol-tensioactivo no iónico constituye menos del 3% del reactivo, o si el reactivo
 25 tiene un EHL menor que aproximadamente 0,7, se hace difícil



cil insolubilizar la cantidad deseada de complejo de antígeno-anticuerpo, en la magnitud requerida para que se complete con éxito la determinación inmunológica. Por otra parte, si la mezcla constituye más del 6% del reactivo, o si el reactivo tiene un EHL mayor que aproximadamente 1,7, se insolubilizan otras proteínas además del complejo de antígeno-anticuerpo deseado, destruyendo así la selectividad de la determinación y haciendo que los resultados no sean significativos.

Desde luego, por una variedad de razones, la solución de reactivo se podría preparar y comercializar de manera que no contuviese el requerido 3 a 6% de mezcla de polietilenglicol y tensioactivo no iónico, o no tuviese el requerido valor de EHL de 0,7 a 1,7. Una mala estabilidad en almacenamiento podría ser una de tales razones. Sin embargo, como se ha indicado antes, tales soluciones requerirían un ajuste antes de o en algún momento durante su uso en una técnica de determinación inmunológica, al intervalo de 3 a 6% y a un valor de EHL de aproximadamente 0,7 a 1,7. Por esta razón, los reactivos que no contienen el requerido 3 a 6% de dicha mezcla o no tienen un valor de EHL de aproximadamente 0,7 a 1,7, pero que se pueden ajustar fácilmente a estos valores antes de o durante el método de ensayo inmunológico, están dentro del ámbito de la invención, aunque inicialmente puedan estar

- 6 FEB 1976



fuera de los parámetros específicos de concentración e in
tervalo de EHL requeridos durante el propio método de de-
terminación.

5 Por ejemplo, la solución de reactivo comercializada
puede requerir, si los parámetros específicos de concen-
tración y valores de EHL caen fuera de los intervalos de
aproximadamente 3% a 6% y aproximadamente 0,7 a 1,7, res-
pectivamente, una dilución, concentración u otras etapas
de ajuste, antes de o en algún punto conveniente durante
10 la realización del método de determinación inmunológica,
con el fin de llevar la solución a un nivel de mezcla de
3 a 6% y un valor calculado de EHL de 0,7 a 1,7. En ta-
les circunstancias, la solución comercializada caería aún
dentro del ámbito de la presente invención. Así, el reac-
15 tivo se podría comercializar con una concentración de mez-
cla mayor que el 6%, p.ej. 8%, que se diluiría antes de
o en algún punto conveniente durante un método de deter-
minación inmunológica, al intervalo de 3 a 6%. Análoga-
mente, el reactivo se podría comercializar con un valor
20 calculado de EHL fuera del intervalo de 0,7 a 1,7, pero
con el requisito de que la solución de reactivo se alte-
rase de alguna forma antes de o en algún punto adecuado
durante un método de determinación inmunológica, para
llevarla a un intervalo calculado de EHL de 0,7 a 1,7.

25 En ciertos casos, el reactivo se podría diluir a



los niveles apropiados con el antisuero a usar en el ensayo, mientras que en otros casos se podría diluir con la muestra de ensayo, o en algunos casos con tanto la muestra de ensayo como el antisuero. El punto importante es que en algún punto durante el método de determinación inmunológica, usualmente antes o en el momento de la reacción antígeno-anticuerpo, se ha de disponer del nivel requerido de 3 a 6% de polietilenglicol y tensioactivo no iónico combinados, y del valor requerido de EHL de 0,7 a 1,7, para que el reactivo de la invención funcione apropiadamente en el método de determinación. El punto del método de determinación en el que se ha de disponer de esos parámetros requeridos puede variar, dependiendo del método concreto de que se trate. Por ejemplo, para un análisis nefelométrico es conveniente preparar y comercializar el reactivo de la invención con una concentración de polietilenglicol y tensioactivo no iónico mayor del 6% y un valor de EHL fuera del intervalo de 0,7 a 1,7. Luego, justamente antes del uso en el análisis nefelométrico, el reactivo se diluye con el antisuero a usar en el análisis, para proporcionar una concentración de polietilenglicol y tensioactivo no iónico entre 3 y 6%, de preferencia aproximadamente 4%, y un valor calculado de EHL dentro del intervalo de 0,7 a 1,7.

Las proporciones relativas entre polietilenglicol y

6 FEB 1976



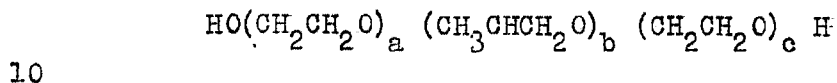
5 tensioactivo no iónico en la mezcla pueden variar dentro de límites amplios, dependiendo mucho del tensioactivo que se esté usando. Como ilustración, la mezcla contiene de aproximadamente 10 a 90% en peso de polietilenglicol y de 10 a 90% de tensioactivo no iónico. Preferiblemente, la mezcla contiene aproximadamente 15 a 85% de polietilenglicol y 15 a 85% de tensioactivo no iónico.

10 Como polietilenglicol componente de la mezcla se puede usar una o más formas o tipos diferentes de polietilenglicol. El polímero de polietilenglicol usado tiene generalmente un peso molecular de aproximadamente 200 a aproximadamente 10.000, y de preferencia de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 6.000. Estos materiales están disponibles en el comercio, por ejemplo, de Union Carbide
15 como CARBOWAX 4.000 o 6.000, y de Dow Chemical Company como PEG 4.000 o 6.000. Se prefiere especialmente un nivel de peso molecular de aproximadamente 4.000.

20 El tensioactivo no iónico componente de la mezcla puede ser cualquier tensioactivo no iónico que produzca en la solución de reactivo un valor calculado de EHL de 0,7 a 1,7, y preferiblemente de aproximadamente 0,7 a 1,3, a una concentración de mezcla de 3 a 6%. Como ilustración, los valores de EHL del propio tensioactivo no iónico pueden estar comprendidos entre aproximadamente 10 a
25 30 más.



Un tensioactivo no iónico particularmente preferido es un copolímero de bloque de óxido de etileno y polioxi propileno. Este polímero concreto y su preparación se describen en la patente de los EE.UU. 2.674.619. Esos
5 copolímeros de bloque se preparan generalmente condensando óxido de etileno con polímero de polioxipropileno, y se pueden representar por la siguiente fórmula estructural:



Para los fines de la invención, estos copolímeros de bloque contienen deseablemente al menos 50% de óxido de etileno en la molécula, y un peso molecular de base hidrófoba de polioxipropileno de al menos 950, análogamente según se describe en las patentes de los EE.UU. 3.450.502,
15 3.577.522 y 3.590.125.

Son ejemplos ilustrativos de tales copolímeros de bloque adecuados los polioles PLURONIC[®] F-38 y F-68, vendidos por Wyandotte Chemicals Corporation. El F-38
20 contiene 80% de unidades hidrófilas de polioxietileno en la molécula, y la base hidrófoba de polioxipropileno tiene un peso molecular de 950. El F-38 es un tensioactivo no iónico particularmente preferido. El F-68 contiene también 80% de unidades hidrófilas de polioxietileno en
25 la molécula, pero la base hidrófoba tiene un peso molecu

-6 FEB 1976

lar de 1.750. El peso molecular total de estos dos polioles PLURONIC[®] es 4.750 y 8.750, respectivamente. También se ha hallado útil el PLURONIC[®] L-125. Se halla más descripción de estos polioles en el boletín de Wyandotte Chemicals Corporation "The Pluronic Grid" (La red Pluronic), sexta edición, cuya sustancia se incorpora aquí por referencia al mismo.

5

En el caso de los tensioactivos no iónicos PLURONIC se prefiere generalmente una mezcla consistente en aproximadamente 20% a 40% en peso de polietilenglicol y aproximadamente 80% a 60% de copolímero de bloque de óxido de etileno y polímero de polioxipropileno.

10

Una solución de reactivo muy preferida contiene aproximadamente una parte en peso de polietilenglicol que tiene un peso molecular de aproximadamente 4.000, y aproximadamente tres partes en peso del material Pluronic F-38. Esta solución se puede preparar en un disolvente salino (p.ej. NaCl al 0,9%), ya sea al o por encima o debajo del nivel deseado de 3 a 6%, y ajustar luego, si es necesario, al nivel deseado de 3 a 6%. Preferiblemente, la solución se prepara como solución al 8% de la mezcla polímera en solución salina, que luego se diluye con antisuero (véanse los Ejemplos 1 y 5 más adelante) u otro diluyente adecuado, antes de su uso en un método de determinación inmunológica. El reactivo diluido contiene así aproximada

15

20

25



mente 1% de polietilenglicol y 3% de F-38. Su valor de EHL de 1,115 se puede calcular como sigue:

$$\begin{array}{rcl} 1\% \text{ de PEG} & : & 0,01 \times 20^{**} = 0,2 \\ 3\% \text{ de F-38} & : & 0,03 \times 30,5^{***} = \underline{0,915} \\ & & 1,115 \end{array}$$

** El EHL del PEG en la bibliografía es 20

*** El EHL del F-38 en la bibliografía es 30,5

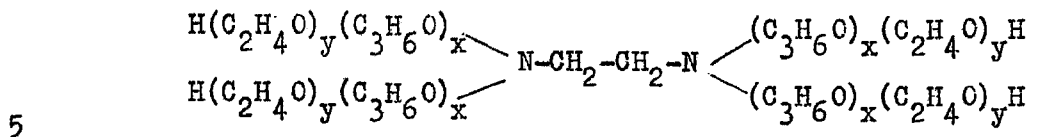
10

También se puede usar amplia variedad de otros tensioactivos no iónicos para complementar al polietilenglicol en la solución de reactivo de la invención, con tal de que proporcionen el valor deseado de EHL de 0,7 a 1,7 a una concentración de mezcla de 3 a 6%. Por ejemplo, se ha hallado que la serie TETRONIC^(R) de tensioactivos no iónicos, disponible de BASF Wyandotte Corporation y descrita en detalle en el folleto de BASF Wyandotte titulado "Technical Data on Tetronic^(R) Series Nonionic Surfactants" (Datos técnicos sobre la serie Tetronic^(R) de tensioactivos no iónicos) y en la patente de los EE.UU. 2.979.528 (dichas publicación y patente se incorporan aquí por referencia) es muy adecuada, particularmente aquellos identificados como TETRONIC^(R) 707, 908, 1107, 1307 y 1508. Los productos TETRONIC^(R) se basan en etilen

20

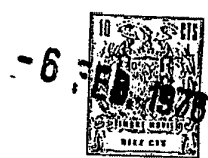
25

diamina, y tienen la fórmula general:



10 El intervalo de peso molecular de la línea TETRONIC[®] puede variar de aproximadamente 1.650 a más de 26.000. Los tensioactivos TETRONIC[®] más preferidos tienen pesos moleculares comprendidos entre aproximadamente 15.000 y 27.000, y valores de EHL de aproximadamente 20 a 30,5. La proporción entre polietilenglicol y tensioactivo TETRONIC[®] en la mezcla puede variar mucho, como se ha discutido antes.

15 Otra familia de no iónicos útiles es la línea de productos PLURAFAC[®], también emanada de BASF Wyandotte, particularmente aquéllos identificados como PLURAFAC[®] 17R8, 25R8, D25, A38 y A39. Los productos PLURAFAC[®] son alcoholes alifáticos primarios de cadena recta oxialcoholados, descritos en más detalle en el folleto de BASF Wyandotte titulado "Technical Data on Typical Physical
 20 Properties of PLURAFAC[®] Nonionic Surfactants" (Datos técnicos sobre propiedades físicas típicas de los tensioactivos no iónicos PLURAFAC[®]). Los productos PLURAFAC[®] preferidos tienen valores de EHL de aproximadamente 10 a 20, y se pueden usar en proporciones ampliamente variables con el polietilenglicol.
 25



Entre otros tensioactivos no iónicos adecuados se incluyen el monoestearato de glicerina y la familia de los alcohol-aril-sulfonatos. Un monoestearato de glicerina preferido está disponible de Atlas Industries, Inc.,
5 bajo la marca registrada ARIACEL[®] 165 (EHL = 11,0), y también se dispone de la misma fuente de un alcohol-aril-sulfonato típico útil, bajo la marca registrada G-3300 (EHL = 11,7).

La anterior relación de tensioactivos no iónicos
10 solo es ilustrativa, ya que se considera que otros de tales tensioactivos caigan dentro del ámbito de la invención, siempre que proporcionen un reactivo que cuando se use en un método de determinación inmunológica, contenga aproximadamente 3 a 6% de una mezcla de polietilenglicol y tensioactivo, tenga un valor calculado de EHL, basado en los
15 valores de los componentes individuales presentes en la solución, de aproximadamente 0,7 a 1,7, y produzca el efecto de reforzar la insolubilización del complejo deseado de antígeno-anticuerpo en la magnitud deseada para perfeccionar la determinación, y sin insolubilizar componentes no
20 deseados ni interferir perjudicialmente de cualquier otra manera con el método de determinación.

Desde luego, puede haber más de un tensioactivo no iónico presente con el polietilenglicol, siempre que se
25 consigan la concentración de la mezcla y el valor de EHL

-6 FEB 1976

de la solución requeridos.

En la selección de un tensioactivo no iónico para uso en la invención, se debe usar uno que también tenga la capacidad de proporcionar una solución de reactivo transparente, al menos en el momento en que se usa por primera vez la solución de reactivo en el método de determinación inmunológico. Esto es para asegurar que el reactivo no interfiera con los resultados del ensayo, o no produzca una precipitación no específica de los componentes de la muestra biológica o reactivos biológicos empleados en el sistema de determinación.

El sistema de reactivo de la invención halla amplia utilidad como mejora en multitud de métodos de determinación inmunológicos usuales, que en un momento u otro, por cualquier razón, requieren una etapa para insolubilizar el complejo de antígeno-anticuerpo formado durante el método de determinación por la reacción de antígeno-anticuerpo. Tales métodos de determinación son bien conocidos por los expertos en la técnica, y no se necesita describirlos aquí en detalle. La aplicabilidad y utilidad de la presente invención en esos diversos métodos de determinación y los detalles de cómo usar el reactivo de la invención en tales métodos serían evidentes para los expertos en la técnica, por lectura de la presente memoria descriptiva, y por ello esas situaciones específicas no requieren



repetición exhaustiva aquí. Por ejemplo, el reactivo de la invención se podría usar para reforzar cualquier sistema que dependa de la precipitación de complejos de antígeno-anticuerpo para producir un fluido transparente que sobrenada, para detección de fluorescencia o colorimétrica. También se podría usar el reactivo para eliminar sustancias que interfieren, que se hallan en fluidos o reactivos biológicos (p.ej. lípidos, sales y proteínas extrañas), para nefelometría y determinaciones enzimáticas o por otros sistemas de determinación. Esto se consigue por eliminación de los reaccionantes de la solución de reacción, con el fin de lavar y volver a suspender esos reaccionantes.

Específicamente, el reactivo de la invención se puede utilizar para aumentar la concentración relativa de complejos de antígeno-anticuerpo insolubles y aumentar el intervalo de ensayo y la sensibilidad de un sistema de de terminación dado. Estos principios se pueden aplicar a la dispersión cuantitativa de luz por complejos inmunes, por nefelometría, siendo esta actualmente una realización preferida de la invención. Los análisis nefelométricos que usan el reactivo de la invención son particularmente útiles en el análisis de las diversas inmunoglobulinas. Sin embargo, pueden utilizar estos reactivos otros sistemas de ensayo que se basan en precipitar anticuerpo, ta-



les como radioinmunodifusión (RID), análisis enzimáticos, y diversos tipos de técnicas electroforéticas tales como inmunolectroforesis (IEF), contraelectroforesis (CEF) y electroinmunodifusión (EID).

5 El reactivo de la invención se puede usar, por ejemplo, para reforzar determinaciones inmunológicas que dependen de la interacción primaria de la técnica de coprecipitación de antígeno-anticuerpo comúnmente usada en determinaciones radioinmunológicas (DRI). Esta característica de insolubilización reforzada de la presente invención se puede utilizar también en las diversas metodologías de unión de anticuerpos o antígenos a partículas inertes usadas como soporte en DRI y determinaciones nefelométricas y fluorométricas, de manera bien entendida por los expertos en la técnica.

10

15

Se han adoptado numerosas técnicas de determinación radioinmunológica para cuantificar concentraciones relativamente pequeñas de constituyentes biológicos que se hallan en los fluidos del cuerpo. Se hace reaccionar un antígeno o anticuerpo marcado con isótopos con el antígeno o antisuero homólogo, para producir complejos de antígeno-anticuerpo inmunes marcados. Estos complejos se han de hacer luego normalmente insolubles mediante un soporte insoluble, reactivo de precipitación u otras técnicas conocidas. El antígeno o anticuerpo marcado, libre o

20

25



-6

sin reaccionar, se puede separar por técnicas de lavado. La concentración radiactiva de los complejos precipitados se determina luego por recuento de centelleo gamma o de líquido. Un ejemplo de un instrumento usado para de-
5 terminaciones de este tipo es el Auro Gamma Counter (dis-
ponible de Nuclear Chicago, Inc.). El reactivo según la
invención es útil para reforzar la etapa requerida de in-
solubilización del complejo, perfeccionando así el análi-
sis. El Ejemplo 6, más adelante, detalla el uso del reac-
10 tivo de la invención en un método de determinación radio-
inmunológica.

También se han adoptado técnicas enzimáticas para
cuantificar pequeñas concentraciones de constituyentes
biológicos que se hallan en los fluidos del cuerpo. Se
15 hace reaccionar un anticuerpo o antígeno marcado con en-
zima, con el anticuerpo o antígeno específico, para pro-
ducir complejos de antígeno-anticuerpo marcados inmunes.
Estos complejos se hacen insolubles mediante un soporte
insoluble, reactivo de precipitación u otra técnica. El
20 anticuerpo o antígeno, marcado con enzima, libre o sin
reaccionar, se puede eliminar por técnicas de lavado.
La enzima unida o reaccionada puede producir entonces una
reacción con un substrato apropiado, para producir una so-
lución que sobrenada, coloreada o fluorescente, que se
25 puede medir con un espectrofotómetro o fluorómetro. Son



ejemplos de instrumentos útiles para este fin el espectro
fotómetro Beckman DB (disponible de Beckman Instruments,
Inc.), y el espectrofluorómetro Aminco-Bowman (disponible
de American Instrument Company). El reactivo según la in-
5 vención también es útil para reforzar la requerida etapa
de insolubilización del complejo, mejorando así el análi-
sis.

La utilidad del reactivo en un análisis nefelométrico
se ha discutido antes en detalle, y se ejemplifica más
10 en el Ejemplo 5 más adelante.

Está claro ahora para los expertos en la técnica que
el reactivo inmunológico perfeccionado de la invención
tiene una amplia gama de utilidad en el campo de los mé-
todos de determinación inmunológica. Usando el reactivo
15 mejorado, el tecnólogo clínico puede hacer una determina-
ción exacta de un amplio intervalo de concentraciones de
muchas proteínas específicas, por ejemplo las inmunoglo-
bulinas IgG, IgA, IgM, transferrina, complemento C3, hap-
toglobina, alfa₁-antitripsina, β -lipoproteína, albúmina,
20 alfa₂-macroglobulina, alfa₁-ácido glicoproteico, y otros
diversos constituyentes biológicos tales como triyodotio-
nina (T₃), tiroxina (T₄), triglicéridos, gonadotropinas
coriónicas humanas, lipoproteínas, y otras muchas cuya
determinación se beneficiaría del efecto de insolubili-
25 zación reforzada producido por la presente invención.

- 6 FEB 1976



En la mayoría de las aplicaciones en las que la invención halla utilidad, el constituyente o constituyentes biológicos de ensayo deseados se mezclan con la solución acuosa de reactivo de la invención, se incuban durante un periodo de tiempo previamente determinado, tal como, por ejemplo, a temperatura ambiente (20-25°C) durante aproximadamente una hora, y luego se lee con la instrumentación apropiada, p.ej. un nefelómetro en el caso de un análisis nefelométrico. Los resultados de las muestras de ensayo se comparan con muestras de referencia, para determinar la concentración desconocida.

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar más la invención, aunque se entenderá que la invención no está limitada a esos ejemplos específicos.

EJEMPLO 1

Se prepara una solución de reactivo mezclando 25 partes en peso de polietilenglicol que tiene un peso molecular de 4.000 con 75 partes en peso de PLURONIC F-38, y se disuelve la mezcla en solución salina normal (NaCl al 0,9%) hasta una concentración de 8% en peso de dicha mezcla. Esta solución se puede diluir, tal como con antisuero, hasta una concentración de mezcla de 4% (proporción EHL - 1,115) como en la etapa 3 del siguiente Ejemplo 5, antes de la incubación, y usar directamente en un método de de-

-6 FEB 1976

terminación inmunológica, o se puede mantener en la forma al 8% hasta que esté lista para uso.

EJEMPLO 2

5 Se repite el Ejemplo 1, salvo en que un polietilenglicol que tiene un peso molecular de 6.000 reemplaza a una cantidad equivalente del material 4.000.

EJEMPLO 3

10 Se repite el Ejemplo 1, salvo en que el PLURONIC F-68 reemplaza a una cantidad equivalente de F-38.

EJEMPLO 4

15 Se repite el Ejemplo 1, salvo en que el Tetronic 707, 908, 1107, 1307, 1508; Plurafac 17R8, 25R8, D25, A38 y A39; Pluronic L125, Arlacel 165; y G-3000 reemplazaron al F-38 en cantidades variables, en una serie de experimentos para preparar una amplia variedad de soluciones de reactivo.

EJEMPLO 5

20 Las soluciones de reactivo inmunológico preparadas en los Ejemplos 1-4 se usan en determinaciones nefelométricas separadas de inmunoglobulinas (IgA, IgG, IgM), complemento C3 y transferrina, efectuándose dicha determinación como sigue:

25

-6 FEB



1. Los controles de referencia 1, 2, 3, 4, 5, 6 (de contenido conocido) para cada uno de dichos constituyentes biológicos se diluyen a 1:100 en solución salina.
- 5 2. Luego se diluyen de forma similar los desconocidos, a 1:100 en solución salina.
3. Cada uno de los antisueros previamente diluidos, de IgG, IgM, IgA, C3 y transferrina, se diluyen a 1:2 con la mezcla al 8% del reactivo inmunológico de los Ejemplos 1, 2, 3 o 4 (según los casos), y se mezclan por inversión, para producir una concentración de 4% del polietilenglicol y tensioactivo no iónico en la solución, y un EHL calculado entre 0,7 y 1,7, en todos los casos.
- 10 4. Se filtra el antisuero a través de un filtro Millipore de 0,45 μ .
5. Se prepara una serie de tubos de ensayo (tubos de cultivo desechables, de 10 mm x 75 mm) etiquetados apropiadamente como en blanco, controles de referencia 1, 2, 3, 4, 5, 6, y desconocido.
- 20 6. Se añade a cada tubo 1 ml de la mezcla diluida de antisuero y reactivo, preparada en la etapa 3.
- 25

-6 FEB 1976

7. Se añaden al tubo apropiado 25 μ l de referencia y diluciones desconocidas, para IgG, IgA y transferrina (100 μ l para IgM y C3).
- 5 8. El tubo exento apropiado recibió correspondientemente 25 o 100 μ l de solución salina.
9. Los tubos se mezclan por inversión y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente (20-25°C).
- 10 10. Se preparan muestras en blanco usando 1 ml de los reactivos filtrados de los Ejemplos 1-4 (según los casos), preparados como en la etapa 3 excepto en que la solución al 8% se diluyó con solución salina en vez de antisuero. Las muestras en blanco se ponen en tubos etiquetados idénticos, como en las etapas de antes (5 y 6).
- 15 11. Se añaden a cada tubo los mismos volúmenes de referencia y muestra, como antes (etapa 7).
- 20 12. Todos los tubos se someten a lectura en el nefelómetro de laser PDQTM (Hyland Laboratories), para determinar el tanto por ciento relativo de dispersión de la luz.
- 25 13. Las muestras en blanco se leen y se restan electrónicamente de los valores de reacción, por el instrumento.

-6 FEB 1976

14. Los resultados de referencia se representan en papel de gráfico lineal, como tanto por ciento relativo de dispersión de la luz frente a la concentración de las referencias.
- 5 15. Los valores desconocidos se determinan por lectura de la curva de referencia.

Los reactivos inmunológicos de la invención usados en esta muestra produjeron una precipitación sustancialmente mayor de los complejos de antígeno-anticuerpo, más carácter lineal en un intervalo más ancho, y mayor sensibilidad que la que se obtuvo con un reactivo que contenía polietilenglicol solo.

10

15 EJEMPLO 6

Este ejemplo describe el uso del reactivo inmunológico de la invención en un método de determinación radioinmunológica para la determinación de hormona estimulada del tiroides humana (HETH).

20 Se preparó una muestra del reactivo inmunológico de la invención mezclando 8,4 ml de una solución al 5% de polietilenglicol en solución salina al 0,9, con 20 ml de tensioactivo no iónico Pluronic F-38 al 6%. Luego se ajustó el volumen de la mezcla a 30 ml con solución salina al 0,9, dando una concentración de reactivo final de

25

- 6 FEB 1976

1,4% de polietilenglicol y 4,2% de F-38.

La determinación radioinmunológica se efectuó como sigue: se mezclaron 0,050 ml de anti-HETH de conejo, absorbida con gonadotropina coriónica humana (GCH), con
5 0,200 ml de patrones de HETH de concentración variable. Luego se añadieron a la mezcla 0,050 ml de un tampón de fosfato, pH 7,4, y se incubó la mezcla durante 2 horas a 37°C. En este punto se añadieron 0,100 ml de HETH marca
do con I^{125} , y se siguió incubando la mezcla durante 3 ho
10 ras a 37°C. Luego se añadió 1,0 ml del reactivo de la invención, preparado como antes, y la mezcla se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Debido a la dilución del reactivo al añadir a la mezcla, la concentración de polietilenglicol y F-38 se redujo de 1,4 y 4,2%
15 a 1 y 3% en peso, respectivamente. La mezcla se centrifugó a 1000 x 9 durante 10 minutos. Si se requiere un lavado de los sólidos centrifugados, la solución de lavado ha de contener la misma concentración que el reactivo de la invención en el momento en que el reactivo se usó
20 por primera vez en la determinación, es decir, 1% de polietilenglicol y 3% de F-38. Luego se decantó el líquido que sobrenadaba, y se recontó el precipitado. Este método se repitió para una variedad de diferentes patrones de HETH, y se obtuvo una curva patrón representando
25 los recuentos de los diversos precipitados frente a la

5 concentración del correspondiente patrón de HETH.

Una vez se hubo obtenido la curva patrón, se efectuó luego la determinación con muestras de en sayo desconocidas, usando el método antes descrito, excepto en que el patrón de HETH se reemplazó
10 por la muestra de ensayo. Entonces se pudo determinar fácilmente el nivel de HETH en la muestra - de ensayo, por la localización del recuento del - precipitado sobre la curva patron.

El uso de la solución de reactivo de la inven
15 ción reforzó la magnitud del precipitado que se - formó, más allá de la que se puede obtener con un reactivo que use polietilenglicol solo, y tuvo co mo resultado una determinación radioinmunológica mejorada.

20 También se pueden conseguir resultados adecua dos de determinación nefelométrica sin presencia del polietilenglicol, por ejemplo con una solución acuosa que contenga aproximadamente 4% en peso del copolímero de bloque de óxido de etileno y políme
25 ro de polioxipropileno. Sin embargo, la mezcla de copolímero de bloque y polietilenglicol antes des crita se prefiere para obtener óptimos resultados.

30 21.1.76 -

5


10

15

REIVINDICACIONES

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:

1ª).- Un método de determinación inmunológica que implica una reacción de un anticuerpo con un antígeno para formar un complejo de anticuerpo-antígeno, caracterizado porque la insolubilización del complejo de antígeno-anticuerpo formado por dicha reacción se aumenta utilizando un reactivo en dicho método de ensayo que comprende una solución acuosa de una mezcla de dicho polietilenglicol y un tensio

 21.1. -76

5 activo no iónico, conteniendo dicha solución acuosa, en uso, aproximadamente 3% a 6% en peso de la mezcla, y teniendo dentro de tal intervalo un valor calculado de EHL (equilibrio hidrófilo-lipófilo) comprendido entre aproximadamente 0,7 a 1,7.

10 2a).- Método según la reivindicación 1a, caracterizado porque dicho reactivo se utiliza para efectuar una determinación nefelométrica, enzimática, electroforética o radioinmunológica.

15 3a).- Método según la reivindicación 1a, caracterizado porque dicho antígeno, anticuerpo y reactivo se incuban para producir dicho complejo de anticuerpo-antígeno, antes de efectuar un análisis nefelométrico efectuando medidas de dispersión de la luz que son función de la concentración de partículas de dicho complejo de anticuerpo-antígeno.

20 4a).- Método según la reivindicación 1a, caracterizado porque dicho reactivo, y dichos anticuerpos y antígeno en forma de inmunoglobulinas, se incuban para producir un complejo de anticuerpo-antígeno de inmunoglobulina insolubilizada, antes de efectuar un análisis nefelométrico efectuando medidas de dispersión de la luz que son función de la concentración de partículas de dicha inmunoglobulina insolubilizada, cuya insolubilización está mejorada por dicho reactivo.

30

5 5a).- Un método nefelométrico de determinación
de constituyentes biológicos, caracterizado por el
empleo de un reactivo que comprende una solución acuosa
de aproximadamente 4% en peso de un polímero de
bloques de óxido de etileno y polioxipropileno para
10 incubar los constituyentes biológicos, insolubili-
zando estos últimos antes de efectuar medidas de dis-
persión de la luz que son función de la concentra-
ción del constituyente insolubilizado.

 6a).- "UN MÉTODO DE DETERMINACIÓN INMUNOLÓGICA".
15 Tal y como se ha descrito en la Memoria que -
antecede, y para los fines que se han especificado.

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

20

Madrid, 03.FEB.1977

P.A.


Fernando de Elizaburu
Por Poder.

25

30

21.1.76

MPB.-

