

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

10	ES	11	NUMERO	10	A1
		21	445.768		
		22	FECHA DE PRESENTACION		
			4. Marzo. 1976		

PATENTE DE INVENCION

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
	31	NUMERO			
		555.215	4.3.1975		Estados Unidos

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			G01N		

54	TITULO DE LA INVENCION
"METODO DE PREPARACION DE UN REACTIVO EN FASE SOLIDA PARA USO EN EL RADIOINMUNOENSAYO DE ANTIGENOS Y ANTICUERPOS Y DE REALIZACION DEL RADIOINMUNOENSAYO"	
29 JUN. 1977	

71	SOLICITANTE (S)
Baxter Laboratoires, Inc.	

DOMICILIO DEL SOLICITANTE	
DEERFIELD, ILLINOIS 60015 (Estados Unidos)	

72	INVENTOR (ES)
D. Frederick Richard Jerome	

73	TITULAR (ES)
Baxter Laboratoires, Inc.	

74	REPRESENTANTE
VICTOR GIL VEGA	

**POOL
QUALITY**

Memoria Descriptiva

El registro de la patente de invención que se solicita tiene por objeto garantizar la explotación exclusiva en todo el territorio nacional y sus posesiones de un método de preparación de un reactivo en fase sólida para uso en el radioinmunoensayo de antígeno y anticuerpos y de realización del radioinmunoensayo, conforme se describe a continuación y se representa gráficamente en los adjuntos dibujos, a título de ejemplo.

Esta invención se relaciona con un reactivo y un método para su uso en la determinación de antígenos, anticuerpos, enzimas y otras proteínas y polipéptidos, hormonas y sustancias similares dotadas de actividad biológica.

En los años recientes se ha creado una serie de ensayos para diagnósticos clínicos que emplean materiales denominados radioisótopos. Estos ensayos han sido adaptados a la determinación de pequeñas concentraciones de varios componentes del suero sanguíneo y otros flúidos biológicos. En la técnica diagnóstica conocida por radioinmunoensayo (RIE), se mide el antígeno por su efecto sobre la fijación de una pequeña cantidad de antígeno trazador radiactivo a una cantidad predeterminada de anticuerpo específico. Esta técnica RIE ha de incluir algún procedimiento para separar el trazador fijado al anticuerpo del trazador no fijado tras completarse la inmunorreacción, de manera que pueda determinarse la radiactividad de los componentes separados mediante cómputo por centelleo.

Hasta ahora se han desarrollado varios procedimientos para separar los componentes trazadores fijados y sin fijar en las técnicas RIE. De acuerdo con un proce-

dimiento clásico, se consigue la adsorción selectiva del
componente trazador libre mediante el uso de un adsorben
te particular, tal como carbón vegetal, como se describe
en la patente estadounidense nº 3.442.819, o mediante el
5 uso de adsorbentes cristalinos inorgánicos en forma coloi
dal, tales como carbonato magnésico o sílice, según se
describe en las patentes de igual nacionalidad Nos. 3.666.854
3.721.528 y 3.776.698. Otro procedimiento conocido emplea
resinas de cambio iónico dotadas de grupos amónicos cuater
narios o aminos fuertemente básicos, tal como se describe
10 en la patente de dicha nacionalidad nº 3.414.383, o bien
emplea la resina en una esponja de poliuretano, como se ex
pone en la patente, también estadounidense, nº 3.206.692.
Otros métodos emplean una fijación covalente del anticuer
po a polímeros insolubles en agua, tales como dextrano y
15 Sephadex (marca comercial de Pharmacia AB, de Upsala, Sue
cia), tal como se expone en la patente estadounidense nº
3.555.143; o una fijación física no específica a varios po
límeros, como se menciona en la patente estadounidense nº
20 3.798.663; o bien un atrapamiento en un material gelifica
do, tal como acrilamida, según se expone en la patente es
tadounidense nº 3.793.445.

Recientemente, se ha informado acerca de un
procedimiento que emplea glicol polietilénico como agente
25 precipitador para separar los componentes fijados y sin
fijar en técnicas NIE: Desbuquois y Aurbach, J. Clin. En
docrinol. Metab. 33, 732 (1972); Barrett y Cohen, J. Clin.
Chem. 18, 1339 (1972); y Creighton y colaboradores, J. Im
munol. 111, 1219 (1973). En este procedimiento, el glicol
30 polietilénico se añade a los materiales de ensayo después

de la operación de fújación, mediante incubación durante cierto período de tiempo. El glicol polietilénico precipita entonces al componente radioidentificado fijado al anticuerpo, respecto al componente no fijado. Aunque este procedimiento es útil, implica numerosas operaciones y una enojosa manipulación de varios componentes por el técnico de laboratorio. A esta técnica van asociados unos elevados conteos no específicos (antígeno radioidentificado no fijado al anticuerpo).

De acuerdo con la presente invención, a diferencia de la técnica anterior, se emplea glicol polietilénico en un reactivo en fase sólida y un método de radioinmunoensayo, de manera que sólo se requiere este único reactivo y no ha de efectuarse ninguna reacción de precipitación, inicialmente implicada con el anticuerpo específico, por el técnico de laboratorio después de la reconstitución del reactivo en fase sólida. La invención utiliza una combinación de un anticuerpo específico y/o un antígeno radioidentificado y el glicol polietilénico, junto con un vehículo de globulina gamma neutralizado a un adecuado pH en un sistema en fase sólida liofilizado. Este producto liofilizado puede suministrarse al laboratorio clínico para su uso en un ensayo RIE conveniente y rápido que sólo requiere la reconstitución y adición del suero objeto de ensayo de un paciente.

Una principal ventaja de la presente invención es una reducción en el número de operaciones necesarias para el RIE por el técnico de laboratorio, incluyendo la eliminación de la adición de un agente separador y su ulterior tratamiento al final de la inamorreacción.

Otra notable ventaja de esta invención es la reducción al mínimo de la desnaturalización del anticuerpo, porque no hay fijación de los lugares activos del anticuerpo, como ocurre con la fijación covalente, iónica o no específica de los polímeros. Se incrementa así la fiabilidad del RIE por una reducción en el número de errores susceptibles de producirse en numerosas operaciones de transferencia con pipeta o por desnaturalización del anticuerpo, tal como ocurre según los procedimientos anteriores.

Se ha comprobado también que el sistema en fase sólida de esta invención simula más aproximadamente una fase de solución homogénea que otros sistemas en fase sólida. Este sistema proporciona así, deseablemente, una gran área superficial sin pérdida de su heterogeneidad, para una reacción con pérdida mínima de actividad del anticuerpo.

El único reactivo en fase sólida liofilizado está asimismo particularmente bien adaptado para un transporte conveniente, por cuanto que implica un material menos fácilmente perturbado y un menor número de reactivos que hasta ahora.

En los adjuntos dibujos:

La figura 1 es una curva patrón que muestra los conteos radiactivos por minuto de antígeno fijado (tiroxina), trazados en función de la concentración de tiroxina (en unidades ordinarias de porcentaje micrográfico), en un ejemplo representativo del sistema de reactivo en fase sólida RIE aquí definido.

La figura 2 muestra los tres sistemas de reactivos RIE representativos, A, B y C del Ejemplo 1, en los

que se han linealizado las curvas patrones (del tipo de la figura 1) mediante transformación logital.

5 En general, se establecen tres sistemas en fase sólida liofilizados de acuerdo con la presente invención. En una versión, se establece un anticuerpo específico en combinación con el glicol polietilénico y el vehículo de globulina gamma. En una segunda versión, se establece un antígeno radioidenticado en combinación con el glicol polietilénico y el vehículo de globulina gamma. En una tercera versión, se establecen un anticuerpo específico y un antígeno radioidenticado, en combinación con el glicol polietilénico y el vehículo de globulina gamma.

10 En las versiones preferidas de la invención, el antígeno radioidenticado se dispone en el fluido reconstituyente. Estas versiones presentan la ventaja adicional respecto a la técnica anterior de que se incrementa la precisión del ensayo RIE en virtud del mayor volumen del que se suministra al antígeno radioidenticado. De acuerdo con procedimientos anteriores que no permiten la reconstitución de un reactivo en fase sólida, el antígeno radioidenticado ha de añadirse en cantidad muy pequeña, siendo así mayor la probabilidad de error que de acuerdo con el presente procedimiento.

25 En las versiones preferidas de la invención, se disponen aproximadamente tres partes en volumen de una solución al 0,01 - 5% de vehículo de globulina gamma y unas cinco partes en volumen de una solución al 5 - 50% de glicol polietilénico, en combinación con una parte aproximadamente, en volumen, de una solución del anticuerpo

30

específico que ha de ser determinado, para fijar aproximadamente del 10% al 90% del antígeno adecuado radioidentificado en una cantidad aproximada de 10_{pg} a 10_{ng} (pg=picogramas; ng=nanogramas) o aproximadamente una parte en volumen de una solución del antígeno radioidentificado en una cantidad aproximada de 10_{pg} a 10_{ng} ó una combinación con una parte, aproximadamente, en volumen de una solución del antígeno radioidentificado y de otra del anticuerpo específico.

El polímero de glicol polietilénico usado en esta invención tiene generalmente un peso molecular de 200 a 10.000 aproximadamente, y preferiblemente de 4.000 a 6.000, también aproximadamente. Puede incorporarse convenientemente en el sistema en fase sólida de esta invención mediante mezclado anterior, para formar una solución acuosa que contenga del 5 al 50% aproximadamente (peso/volumen) de glicol polietilénico y preferiblemente un 30% de este polímero, aproximadamente.

Pueden usarse varias fuentes conocidas de globulina gamma para obtener el vehículo de dicha globulina usado en esta invención, siendo una fuente preferida la fracción de plasma humano Cohn II, que es rica en IgG. Otras fuentes adecuadas son el suero fraccionado con sulfato amónico y la fracción de globulina gamma bovina. Para su incorporación en el sistema en fase sólida de esta invención, la globulina gamma se diluye preferiblemente en una solución neutralizadora acuosa que tenga un pH de 4 a 10 aproximadamente y una concentración aproximada del 0,01 al 5% (peso/volumen) y preferiblemente del 3,2%, aproximadamente.

El anticuerpo específico para el antígeno a ensayar se diluye para permitir una ideal asociación estequiométrica con el antígeno objeto de ensayo, a fin de proporcionar una óptima sensibilidad en el ensayo. Ejemplos de tales antígenos que puedan ensayarse de acuerdo con la presente invención, son la tiroxina, la triiodotironina, la digoxina y la digitoxina. Esta dilución se efectúa preferiblemente con material neutralizador similar al empleado para diluir el vehículo de globulina gamma anteriormente expuesta.

Los anteriores ejemplos de antígenos no son limitativos, sino que se indican solamente a efectos ilustrativos. Pequeñas moléculas, tales como esteroides, drogas y péptidos, pueden adaptarse fácilmente a su empleo en esta invención, así como pequeñas y grandes proteínas, virus, ácidos nucleicos, por ejemplo angiotensinas I y II, aldosterona, hormona estimulante del tiroides (HET) y globulina fijadora de tiroxina (GFT), y otros compuestos, tal como resultará evidente para el experto en la materia.

Los antígenos radioidentificados que pueden usarse para los específicos anticuerpos antes citados son, por ejemplo, la ^{125}I -tiroxina, ^{125}I -triiodotironina, ^{125}I -digoxina y ^{125}I -digitoxina. Todos estos antígenos radioidentificados son comercialmente obtenibles. Otros radioisótopos que pueden emplearse para preparar antígenos radioidentificados adecuados para su empleo en esta invención, son, por ejemplo, ^{131}I , ^3H , ^{14}C y ^{57}Co . El antígeno se identifica preferiblemente con ^{125}I ó cualquier otro radioisótopo para una actividad específica de 1 a 1.000 microcuries por microgramo aproximadamente ($\mu\text{curies}/\mu\text{g}$)

de antígeno. El antígeno radioidenticado se diluye tam-
bien preferiblemente en material neutralizador similar
al empleado para diluir el vehículo de globulina gamma
anteriormente expuesto. Esta dilución depende de la acti-
5 vidad específica inicial y de las desintegraciones dese-
das por minuto (dpm), requeridas para realizar un conteo
y sensibilidad óptimos del ensayo.

Ejemplos de neutralizadores que pueden em-
plearse para la citada dilución son los barbitales, tris,
10 fosfatos y boratos que poseen el citado pH de 4 a 10 apro-
ximadamente. Un neutralizador preferido es el barbital
que comprende un 0,02% molar de barbital sódico y un 0,1%
(peso/volumen) de albúmina de suero bovino, con pH de 8,4.

Cuando se emplean los antígenos de tiroxina
15 o triiodotironina, el neutralizador contiene también pro-
feriblemente 8-anilinoftaleno-1-sulfonato amónico o só-
dico o el ácido libre (ANS) como desacoplador del antígeno
respecto a la globulina fijadora de la tiroxina (GFT).
Este material desacoplador se usa en el neutralizador en
20 una concentración del 0,1 al 0,95% y preferiblemente del
0,35% (peso/volumen), aproximadamente. Los antígenos de
tiroxina y triiodotironina se identifican preferiblemente
también con radioisótopo a una actividad específica de 50
a 100 μ curios/ μ g de antígeno, aproximadamente.

25 La liofilización de cualquiera de los tres
anteriores sistemas de reactivos RIE puede efectuarse por
cualquier técnica de liofilización convencional y se rea-
liza preferiblemente en tubos de ensayo clásicos de vidrio
o plástico, que pueden usarse luego directamente en los
30 procedimientos de ensayo RIE por el técnico de laboratorio.

El procedimiento de ensayo RIE variará según sea el sistema en fase sólida liofilizado empleado, de los tres referidos. Así, cuando el sistema en fase sólida RIE contenga un anticuerpo específico, la solución reconstituyente deberá contener el antígeno radioidenticado, en tanto que cuando el sistema en fase sólida RIE contenga antígeno radioidenticado, la solución reconstituyente deberá contener el anticuerpo específico. Cuando el sistema en fase sólida RIE contenga anticuerpo específico y antígeno radioidenticado, la solución reconstituyente podrá ser agua destilada. Pueden usarse aproximadamente 1.000 microlitros (μ l) de solución reconstituyente por 0,15 gramos aproximadamente del sistema en fase sólida liofilizado RIE, por tubo. Puede emplearse cualquier tamaño de tubo convencional, siendo preferible sin embargo el de 12x75mm.

Después de la reconstitución, se añade al sistema en fase sólida RIE reconstituido el suero del paciente u otro desconocido, preferiblemente en una cantidad aproximada de 25 a 200 μ l. La cantidad de suero depende en general del ensayo que se emplee. Para la tiroxina, se utilizan preferiblemente 25 μ l de suero. Cuando se emplean más de 200 μ l aproximadamente de suero del paciente en el procedimiento de ensayo, será generalmente innecesario usar globulina gamma en el reactivo en fase sólida, pues ya se encuentra suficiente globulina gamma presente en la muestra del paciente. La mezcla del sistema en fase sólida RIE reconstituido y de suero del paciente se incuba luego durante 30 a 60 minutos aproximadamente, a unos 37°C, se enfría a temperatura ambiente y se centrifuga. Se decanta o aspira el material sobrenadante y se cuenta la radiactivi-

dad en el restante precipitado, con un contador de cente-
llas o espectrómetro gamma.

5 Se realizan patrones de control paralelamente con las muestras desconocidas y se prepara a partir de ellos una curva patrón. Estos patrones de control con-
10 tienen concentraciones predeterminadas del antígeno o anticuerpo objeto de ensayo. Por ejemplo, puede usarse una serie graduada de cinco patrones de control en una cantidad de 25 μ l cada uno de ellos, que contengan respectivamente 0, 2,5, 5, 10 y 20 micrográmicos (μ g) de tiroxi-
na, para preparar una curva patrón para la tiroxina. Luego se determina la concentración de tiroxina en la muestra desconocida, trazando los valores obtenidos para la misma en la curva patrón.

15 Los cálculos realizados se basan en la metodología clásica. Los conteos en el tubo que contiene suero libre de antígeno (patrón de control con cero antígeno) se establecen en un 100% (definidos como B_0). Al incrementar el antígeno en el patrón, disminuyen los con-
20 teos (definidos como B) en el precipitado y tales conteos se dividen por los existentes en el tubo cero, para dar valores B/B_0 . Estos valores pueden trazarse contra el μ g de antígeno en papel gráfico lineal. En la figura 1 se ilustra una curva patrón típica. En la figura 2 se usa la
25 transformación logital de B/B_0 y el logaritmo de concentración de antígeno para convertir la curva sigmoide en una línea recta.

30 En algunos casos puede ser deseable establecer un patrón de control no específico que no contenga ningún anticuerpo específico en el reactivo en fase sólida.

RIE o en la solución reconstituyente. Este patrón de control puede usarse para determinar el antígeno radioidentificado no específicamente atrapado u ocluido en el reactivo en fase sólida. En estos casos, se determina el verdadero trazador de fijación sustrayendo los conteos no específicos de todas las muestras.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, aunque se comprenderá que la invención no se limita a tales ejemplos.

10

Ejemplo 1

Se prepara un reactivo en fase sólida para su uso en el radioinmunoensayo de anticuerpo de tiroxina, a partir de los siguientes reactivos acuosos:

15

(a) Neutralizador de barbital - barbital sódico 0,08 molar, pH 8,4.

(b) Barbital-ASB - barbital sódico 0,08 molar, 0,1% (peso/vol.) de albúmina de suero bovino (ASB), pH 8,4.

20

(c) ANS - 0,35% (peso/vol.) de ácido 8-anilino -1-naftaleno sulfónico (ANS) en la anterior solución de barbital-ASB.

(d) IgG - 3,2% (peso/vol.) de fracción de plasma humano Cohn II en la anterior solución de barbital-ASB.

25

(e) Anticuerpo específico - Anticuerpo para tiroxina, diluido con la anterior solución de barbital-ASB para fijar aproximadamente un 40% de tiroxina radioidentificada.

30

(f) Antígeno radioidentificado - ¹²⁵I-tiroxina, diluida con la anterior solución de barbital-ASB aproximadamente a 150 pg (aproximadamente 40.000 cpm) por ml.

(g) Glicol polietilénico - 30% glicol polietilénico (peso/volumen) con un porcentaje molar de 6.000 aproximadamente, en agua destilada.

5 Luego se prepara una solución de vehículo de globulina gamma mezclando una parte en volumen de cada una de las tres anteriores soluciones de (b) barbital-ASB, (c) ANS y (d) IgG.

10 Seguidamente se preparan soluciones combinadas a partir de los anteriores reactivos para tres sistemas de ensayo RIE, como sigue:

	<u>Reactivo</u>	<u>Proporciones en volumen</u>
15	Sistema reactivo (A) Vehículo de globulina gamma	3
	Anticuerpo específico	1
	Glicol polietilénico	5
20	Sistema reactivo (B) Vehículo de globulina gamma	3
	Antígeno radioidenticado	1
	Glicol polietilénico	5
25	Sistema reactivo (C) Vehículo de globulina gamma	3
	Anticuerpo específico	1
	Antígeno radioidenticado	1
	Glicol polietilénico	5

Los anteriores sistemas reactivos RIE preparados se pasan luego a tubos de ensayo plásticos de 12x75mm, usando 900 µl por tubo de Sistema Reactivo RIE (A) ó (B) ó 1000 µl por tubo de Sistema Reactivo RIE (C). A continuación se liofilizan las soluciones en forma compactada seca y sólida en los tubos.

30 Los anteriores reactivos en fase sólida se usan en pruebas de radioinmunoensayo como sigue.

Sistema reactivo (A)

(1) Añadir 1000 µl de reactivo (f), antígeno radioidentificado, a cada tubo que contenga sistema reactivo (A) liofilizado.

5 (2) Añadir 25 µl de patrón de control o suero sanguíneo del paciente.

(3) Incubar durante 30 minutos a 37°C.

(4) Enfriar a temperatura ambiente (25°C aproximadamente) y centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.

10 (5) Decantar la fase líquida.

(6) Contar la radiactividad en el precipitado con un espectrómetro gamma.

La curva patrón obtenida se ilustra en la figura 2,

15

Sistema reactivo (B)

(1) Añadir 1000 µl de reactivo (e), anticuerpo específico, a cada tubo que contenga sistema reactivo liofilizado (B).

20 (2) Añadir 25 µl de patrón de control o suero sanguíneo del paciente.

(3) Incubar durante 30 minutos a 37°C.

(4) Enfriar a temperatura ambiente (25°C aproximadamente) y centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.

25 (5) Decantar la fase líquida.

(6) Contar la radiactividad en el precipitado con un espectrómetro gamma.

La curva patrón obtenida se ilustra en la figura 2.

Sistema reactivo (C)

(1) Añadir 1000 µl de agua destilada a cada tubo que contenga sistema reactivo (C) liofilizado.

5 (2) Añadir 25 µl de patrón de control o suero sanguíneo del paciente.

(3) Incubar durante 30 minutos a 37°C.

(4) Enfriar a temperatura ambiente (25°C aprg xidamento) y centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.

(5) Decantar la fase líquida.

10 (6) Contar la radiactividad en el precipitado con un espectrómetro gamma.

La curva patrón obtenida se ilustra en la fi gura 2.

15 Por cada uno de los anteriores ensayos se rea lizan patrones de control (tal como se ilustra anteriormen te), en los que se utilizan soluciones de concentraciones predeterminadas de tiroxina en lugar del suero del paciente. Luego se determina la concentración de tiroxina en la mues tra del paciente mediante comparación con la curva patrón
20 preparada a partir de los valores trazados para los patro nes de control.

Ejemplo 2

25 Se repite el Ejemplo 1, con la excepción de que se utiliza anticuerpo para triiodotironina y ¹²⁵I-triio dotironina en lugar del anticuerpo para tiroxina y ¹²⁵I-ti roxina, respectivamente, y la cantidad de suero usada para esta ensayo es de 200 µl.

Ejemplo 3

30 Se repite el Ejemplo 1, con la excepción de

que se emplea anticuerpo para digoxina y ¹²⁵I-digoxina en lugar del anticuerpo para tiroxina y ¹²⁵I-tiroxina, respectivamente.

5

Ejemplo 4

Se repite el Ejemplo 1, con la excepción de emplearse anticuerpo para digitoxina y ¹²⁵I-digitoxina en lugar del anticuerpo para tiroxina y ¹²⁵I-tiroxina, respectivamente.

10

Pueden idearse otros ejemplos y modificaciones de los anteriores por el experto en la materia tras la lectura de la anterior descripción, sin apartarse del espíritu y ámbito de la invención, pretendiéndose que todos esos ejemplos y modificaciones queden incluidos en las adjuntas reivindicaciones.

15

NOTA DE REIVINDICACIONES

20

Se reivindica como de propia y nueva invención, a favor de BAXTER LABORATORIES, INC, con domicilio en Deerfield, Illinois 60015 (EE.UU), lo especificado en las siguientes reivindicaciones:

25

1.- Método de preparación de un reactivo en fase sólida para uso en el radioinmunoensayo de antígenos y anticuerpos y de realización del radioinmunoensayo, caracterizado en que la preparación del reactivo comprende el mezclado de (a) material seleccionado entre el grupo consistente en anticuerpo específico y antígeno radioidentificado, (b) glicol polietilénico dotado de un peso mole

30

cular de 200 a 10.000 aproximadamente, y (c) globulina gamma, en solución acuosa neutralizada a un pH de 4 a 10 aproximadamente, liofilizándose seguidamente la mezcla.

5 2.- Método de preparación de un reactivo en fase sólida para uso en el radioinmunoensayo de antígenos y anticuerpos y de realización del radioinmunoensayo, según la reivindicación 1, caracterizado en que el glicol polietilénico tiene un peso molecular de 4000 a 6000 aproximadamente.

10 3.- Método de preparación de un reactivo en fase sólida para uso en el radioinmunoensayo de antígenos y anticuerpos y de realización del radioinmunoensayo, según la reivindicación 1, caracterizado en que se mezclan tres partes de (c) y cinco partes de (b) con una parte de anticuerpo específico o antígeno radioidentificado o con una parte de anticuerpo específico y otra de dicho antígeno.

15 4.- Método de preparación de un reactivo en fase sólida para uso en el radioinmunoensayo de antígenos y anticuerpos y de realización del radioinmunoensayo, según la reivindicación 1, caracterizado en que el antígeno es seleccionado entre el grupo consistente en tiroxina, triiodotironina, digoxina y digitoxina.

20 5.- Método de preparación de un reactivo en fase sólida para uso en el radioinmunoensayo de antígenos y anticuerpos y de realización del radioinmunoensayo, según la reivindicación 1, caracterizado en que el anticuerpo es específico para el antígeno de la reivindicación 4.

25 6.- Método de preparación de un reactivo en fase sólida para uso en el radioinmunoensayo de antígenos y anticuerpos y de realización del radioinmunoensayo, se-

30

gún la reivindicación 1, caracterizado en que la radioidentificación es ^{125}I con una actividad específica de 1 a 1000 μcuries por μgramo de antígeno, aproximadamente.

5 7.- Método de preparación de un reactivo en fase sólida para uso en el radioinmunoensayo de antígenos y anticuerpos y de realización del radioinmunoensayo, según la reivindicación 1, caracterizado en que el neutralizador es de barbital, con pH 8,4.

10 8.- Método de preparación de un reactivo en fase sólida para uso en el radioinmunoensayo de antígenos y anticuerpos y de realización del radioinmunoensayo, según la reivindicación 7, caracterizado en que el neutralizador comprende aproximadamente barbital sódico 0,38 molar y un 0,1% aproximadamente de albúmina de suero bovino.

15 9.- Método de preparación de un reactivo en fase sólida para uso en el radioinmunoensayo de antígenos y anticuerpos y de realización del radioinmunoensayo, según la reivindicación 8, caracterizado en que el neutralizador contiene además aproximadamente un 0,25% de ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfónico o su sal sódica o amónica.

20 10.- Método de preparación de un reactivo en fase sólida para uso en el radioinmunoensayo de antígenos y anticuerpos y de realización del radioinmunoensayo, según las anteriores reivindicaciones, caracterizado en que el radioinmunoensayo comprende la reconstitución del reactivo en fase sólida obtenido según las reivindicaciones anteriores con diluyente acuoso y la ulterior adición del suero del paciente, incubación a 37°C aproximadamente, con 25 centrifugación, separación de la fase líquida y conteo de la radiactividad del restante precipitado.

30

11.- Método de preparación de un reactivo en fase sólida para uso en el radioinmunoensayo de antígenos y anticuerpos y de realización del radioinmunoensayo, según la reivindicación 10, caracterizado en que el glicol polietilénico tiene un peso molecular de 4000 a 6000 aproximadamente.

12.- Método de preparación de un reactivo en fase sólida para uso en el radioinmunoensayo de antígenos y anticuerpos y de realización del radioinmunoensayo, según la reivindicación 10, caracterizado en que se mezclan tres partes de (c) y cinco partes de (b) con una parte de anticuerpo específico o antígeno radioidentificado o una parte de cada uno de ellos.

13.- Método de preparación de un reactivo en fase sólida para uso en el radioinmunoensayo de antígenos y anticuerpos y de realización del radioinmunoensayo, según la reivindicación 10, caracterizado en que el antígeno es seleccionado entre el grupo consistente en tiroxina, triiodotironina, digoxina y digitoxina.

14.- Método de preparación de un reactivo en fase sólida para uso en el radioinmunoensayo de antígenos y anticuerpos y de realización del radioinmunoensayo, según la reivindicación 10, caracterizado en que el anticuerpo es específico para el antígeno de la reivindicación 13.

15.- Método de preparación de un reactivo en fase sólida para uso en el radioinmunoensayo de antígenos y anticuerpos y de realización del radioinmunoensayo, según la reivindicación 10, caracterizado en que la radioidentificación es ¹²⁵I con una actividad específica de 1 a 1000 pcuries por μ grama de antígeno, aproximadamente.

5 16.- Método de preparación de un reactivo en fase sólida para uso en el radioinmunoensayo de antígenos y anticuerpos y de realización del radioinmunoensayo, según la reivindicación 10, caracterizado en que el neutralizador es de barbital, con un pH de 8,4.

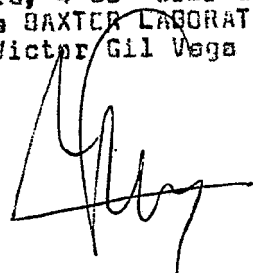
10 17.- Método de preparación de un reactivo en fase sólida para uso en el radioinmunoensayo de antígenos y anticuerpos y de realización del radioinmunoensayo, según la reivindicación 16, caracterizado en que el neutralizador comprende aproximadamente barbital sódico 0,98 mg/lar y un 0,1% aproximadamente de albúmina de suero bovino.

15 18.- Método de preparación de un reactivo en fase sólida para uso en el radioinmunoensayo de antígenos y anticuerpos y de realización del radioinmunoensayo, según la reivindicación 17, caracterizado en que el neutralizador contiene además un 0,35% aproximadamente de ácido 6-anilino-1-naftaleno sulfónico o su sal sódica o amónica.

20 19.- "MÉTODO DE PREPARACION DE UN REACTIVO EN FASE SOLIDA PARA USO EN EL RADIOINMUNOENSAYO DE ANTIGENOS Y ANTICUERPOS Y DE REALIZACION DEL RADIOINMUNOENSAYO".

Tal y como se deja descrito en la memoria precedente que consta de veinte hojas mecanografiadas por una sola cara y planos de forma y tamaño reglamentarios.

Madrid, 4 de Marzo de 1976
P.A. de BAXTER LABORATORIES, INC
Victor Gil Vega



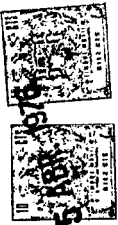
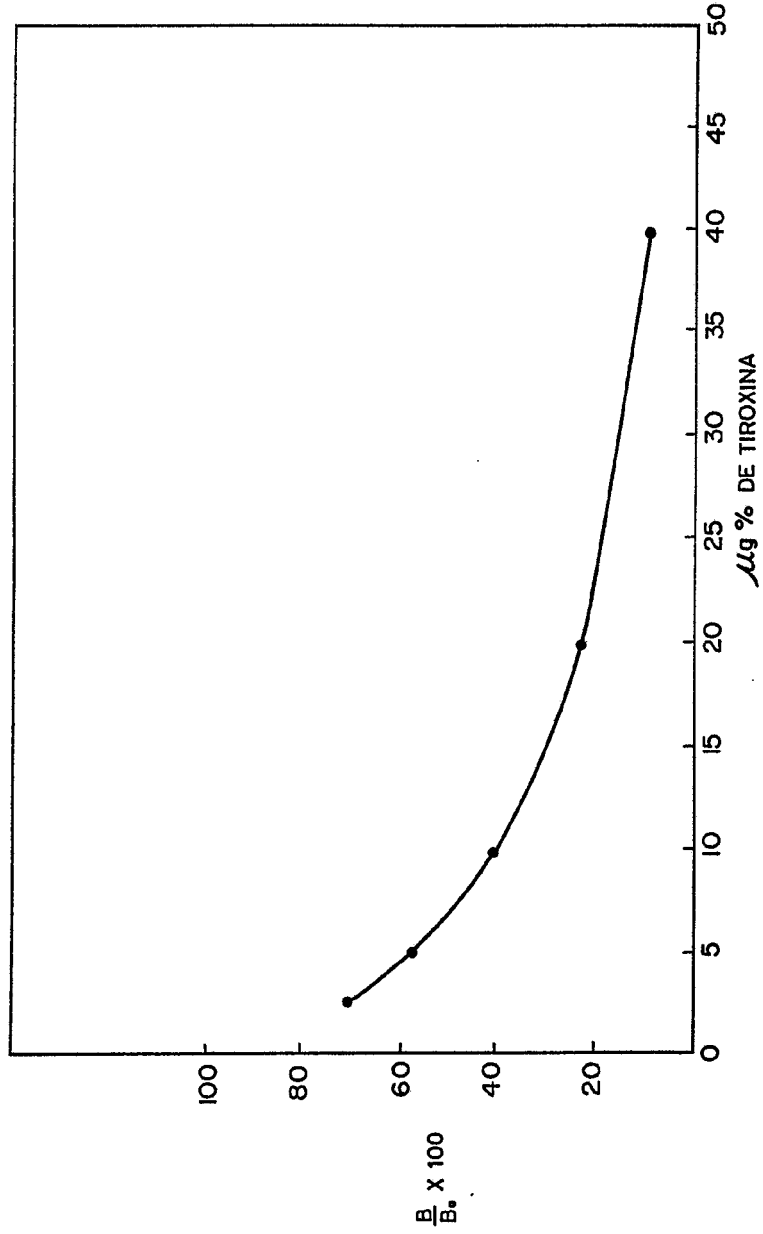
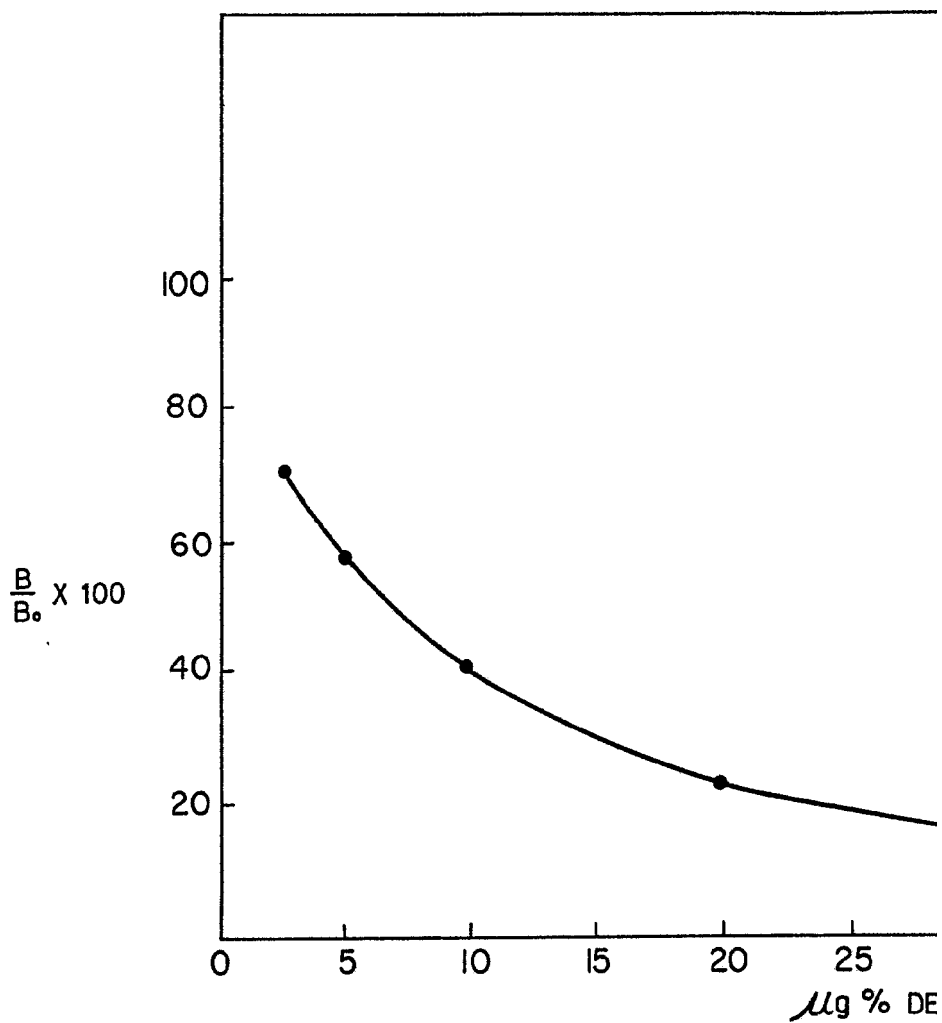


FIG. 1.



Madrid, 1^o de Marzo de 1.976
P.A. *[Signature]*

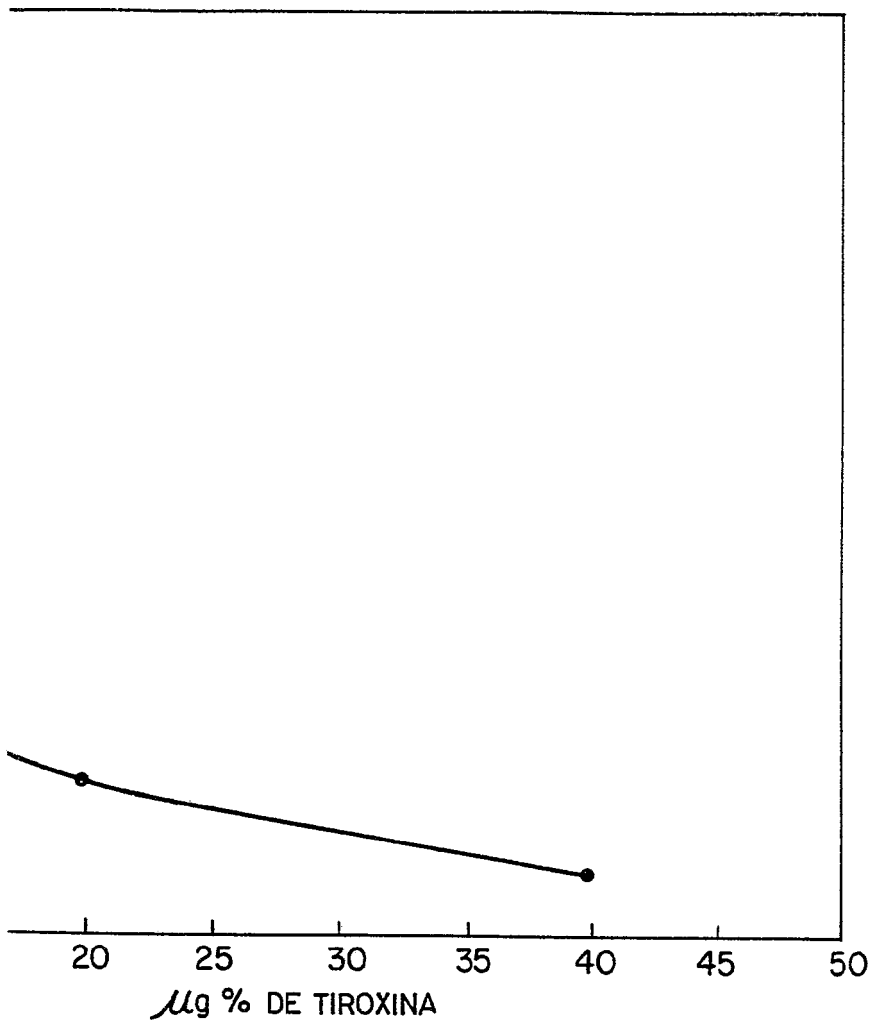
FIG. 1.



ESCALA VARIABLE

10
5 ABR 1976
SECRETARIA DE SALUD
SECRETARIA DE SALUD

FIG. 1.

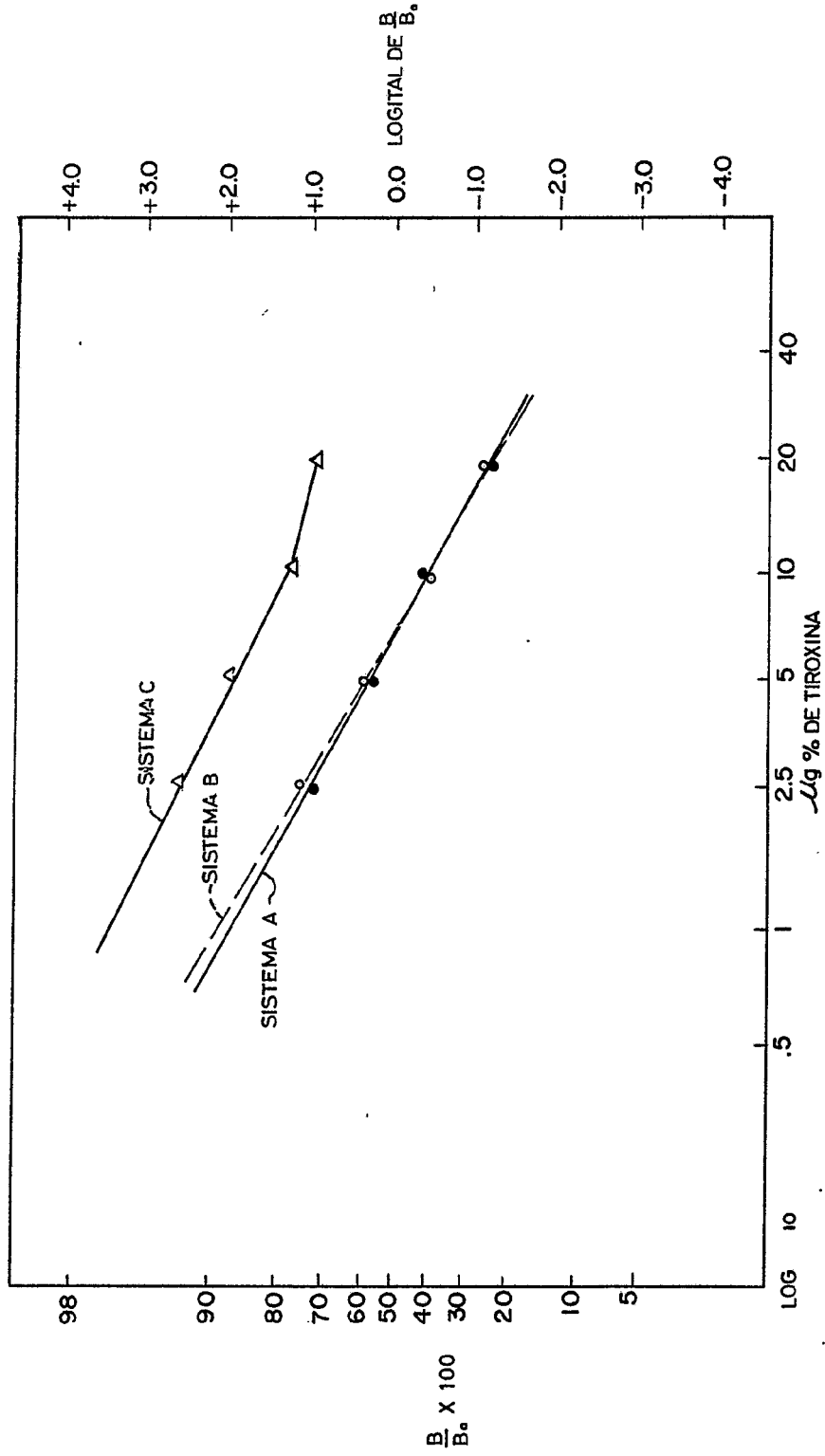


Dr. Pardo

SECRETARIA DE SALUD



FIG. 2.



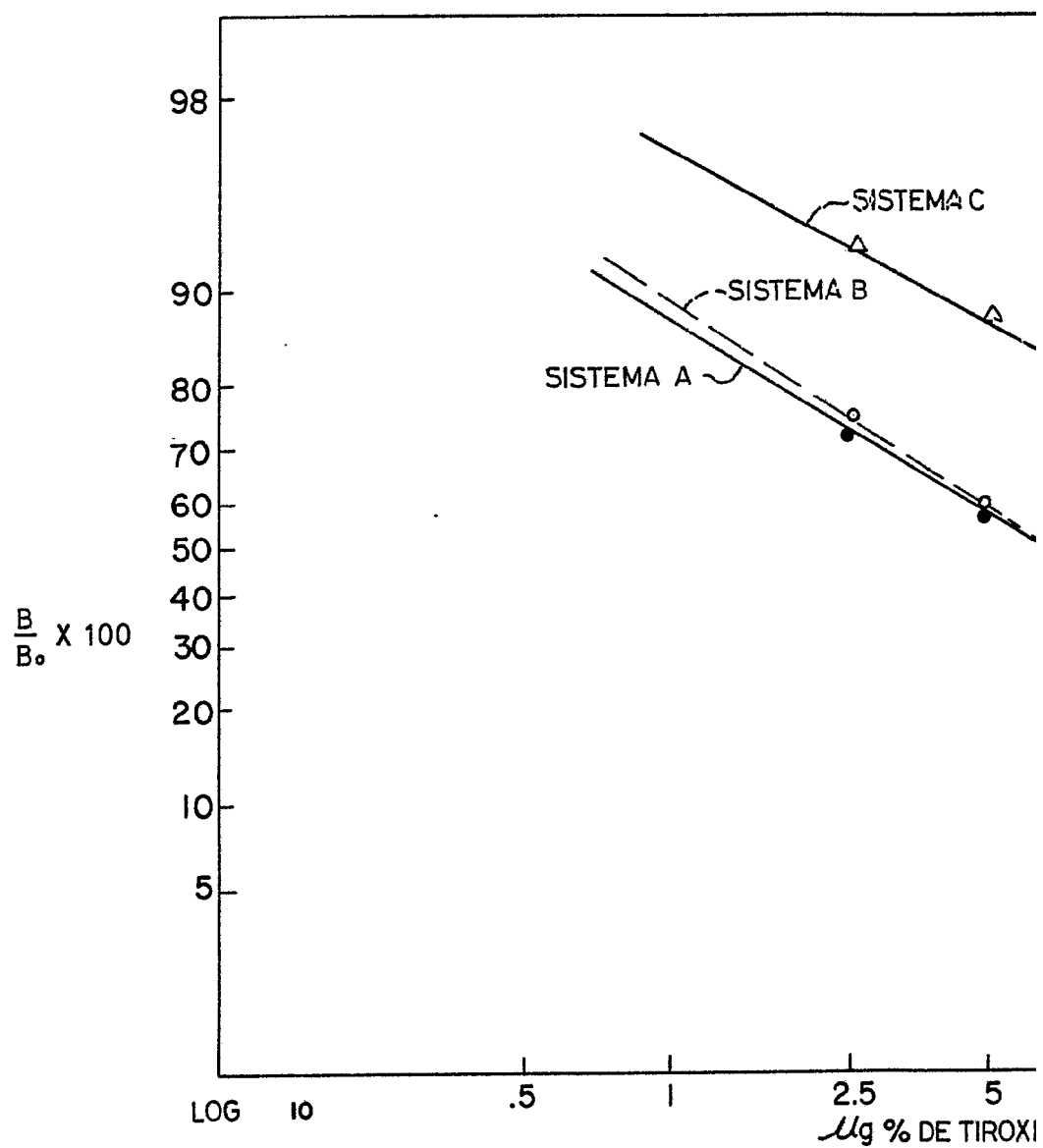
LOGITAL DE $\frac{B}{B_0}$

Madrid, A de Marzo de 1.976

P.A.

ESCALA VARIABLE

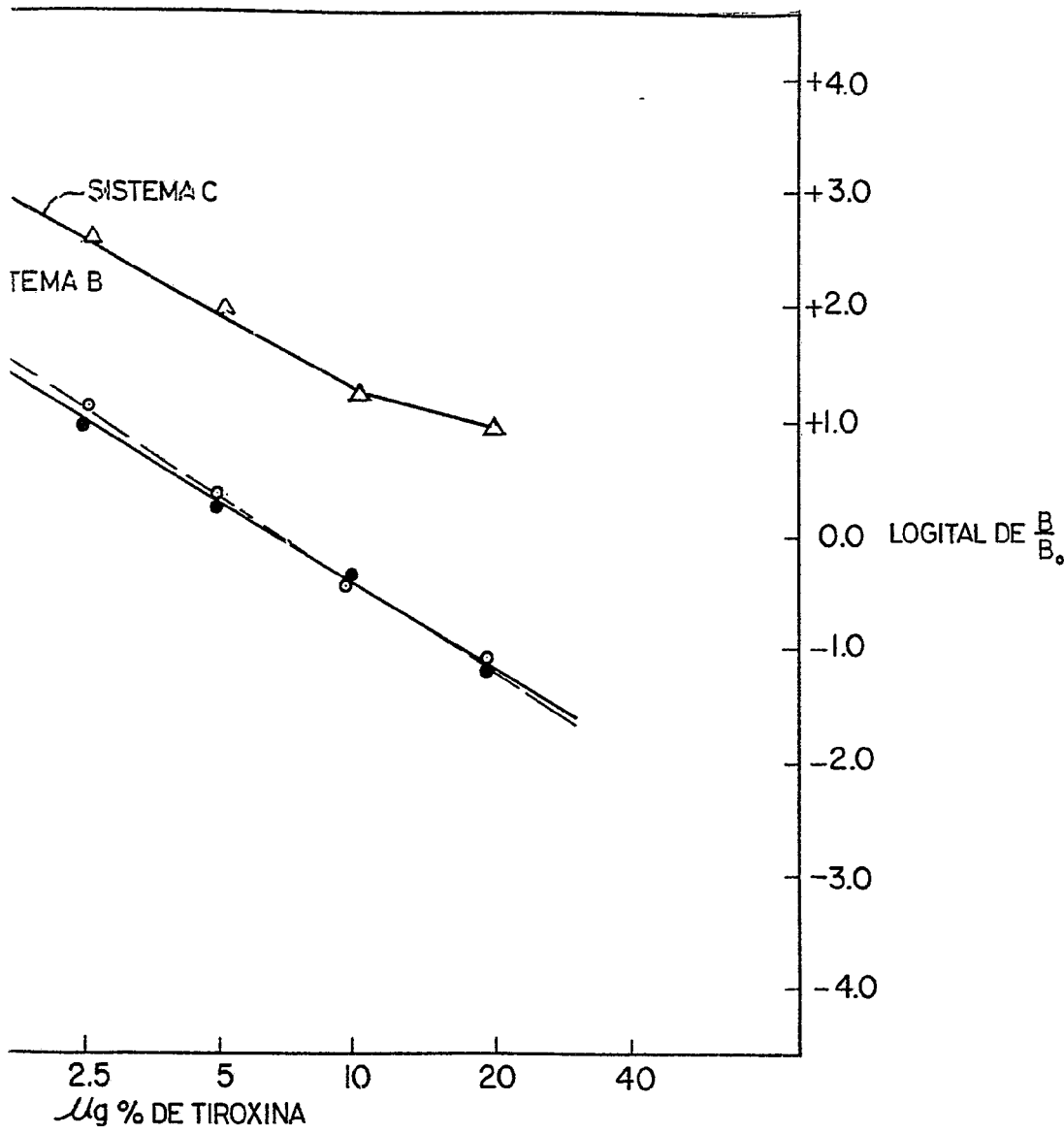
FIG. 2.



ESCALA VARIABLE

10
5 ABR 1976
10
10

FIG. 2.



Madrid, 4 de Marzo de 1.976

P.A.