



⑩ ES	⑪ NUMERO	⑬ A 1
	⑫ 454.172	
	⑭ FECHA DE PRESENTACION	
	⑮ 11.510.1976	

P.- 64.648

PATENTE DE INVENCION

⑯ PRIORIDADES:		
⑰ NUMERO	⑱ FECHA	⑲ PAIS
468.649	10.5.74	EE. UU.
⑳ FECHA DE PUBLICIDAD	㉑ CLASIFICACION INTERNACIONAL	㉒ PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G01N	437.523
㉓ TITULO DE LA INVENCION		
"UN METODO PARA ANALIZAR UNA PLURALIDAD DE MUESTRAS LIQUIDAS"		
㉔ SOLICITANTE (S)		
UNION CARBIDE CORPORATION		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
270 Park Avenue, Nueva York, Nueva York, 10017, Estados Unidos de America		
㉕ INVENTOR (ES)		
Stephen Irving Shapiro y Gerhard Ertingshausen		
㉖ TITULAR (ES)		
㉗ REPRESENTANTE		
D. ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ		

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 importante, 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 sustancias 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,

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

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

10 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

15 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.

20 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

25

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 comprenda un miembro de soporte 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

5 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.

10 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 15 cavidades 130 y 140 pueden ser, por lo tanto, cargadas 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 20 cavidades 140 y se mezcle y reaccione con las muestras 160 de las cavidades 140. La velocidad del motor 30 se regula 25

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 sustancia existente en las muestras 160. En la 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 aquella 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 envoltantes 210 de vidrio abiertas por la parte superior, que están asentadas de manera separable en los tubos 65. El material líquido

5 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, distribuyéndose 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 10 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 15 te 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 20 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- 25

lumna de gel puede ser separado rápidamente mediante elu-
ción 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
5 empleados sea radioactivo, cada uno de los tubos 65 se pue-
de retirar del anillo 70, pudiéndose medir la radioactivi-
dad de su contenido 152, utilizando la disposición conven-
cional de la figura 3, que comprende un detector de rayos
gamma 230, por ejemplo, una combinación de tubo fotomultipli-
10 cador/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 nu-
mérica o digital. Las señales así obtenidas para cada tubo
65 pueden ser relacionadas con la concentración existente
15 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 comu-
nica con la cavidad 140 de la hilera exterior, con la cual
20 está alineada, mediante un medio de paso similar a una cu-
beta o depresión, indicado por 500, el cual está formado por
las superficies laterales y por la superficie del fondo as-
cendente de una cavidad interior 130. Con una rotación y
fuerza centrífuga suficientes, el líquido existente en la
25 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 ha 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, obteniéndose

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:

5

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 $t = 0$, viene dada por:

10

$$C = \frac{A_0^2 K_1 t}{1 + A_0 K_1 t}$$

15

en la que:

A_0 es la concentración inicial de los reactivos A y B.

20

$K_1 = A e^{-E_a/RT}$: ecuación de Arrhenius, en la que A es el factor de frecuencia, E_a es la energía de activación de la reacción, T es la temperatura de la reacción y R es la constante universal de los gases.

25

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 cuales 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 radioactivos combinada con el anticuer-

po, respecto del reactivo T-4 marcado con isótopos radiac-
tivos libre en las cavidades 140, proporciona una medida
de la concentración inicial de reactivo T-4 en las mues-
tras de suero. Por lo tanto, cuando la reacción ha trans-
5 currido a la velocidad inicial durante un corto tiempo su-
ficiente para proporcionar datos de señales radiactivas
significativos y mucho antes de que se alcance el equili-
brio de la reacción, se aumenta la rotación del disco 110
hasta un valor superior, para el cual los contenidos de
10 las cavidades exteriores 140 son impulsados por la fuerza
centrífuga a entrar en los medios de separación comunican-
tes 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
15 reaccionado, a través de los medios de separación 200 sien-
do 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 com-
20 plejo, 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 com-
plejo separado de anticuerpo y reactivo T-4, comparada con
un patrón, proporciona una medida del contenido inicial de
25 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

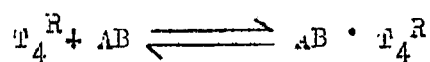
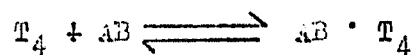
soluciones "patrón", cada una de ellas de diferentes con-
 centraciones de T-4, pero conocidas, por duplicado, fue-
 ron sometidas a ensayo simultáneamente. Este se efectuó
 cargando dos cavidades exteriores 140 del disco 110, con
 35 microlitos cada una, de una muestra clínica particular
 de suero, 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 exte-
 riores 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 desig-
 nadas 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:

	<u>Patrón</u>	<u>T-4 (microgramos/100 ml)</u>
	a	0
	b	2
	c	6
20	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

destilada. Adicionalmente, a cada una de las cavidades exteriores 140 cargada como se ha descrito anteriormente, se añadieron 50 microlitos de una solución radiactiva $P-4-^{125}I$ (preparada como se describe en lo que sigue).

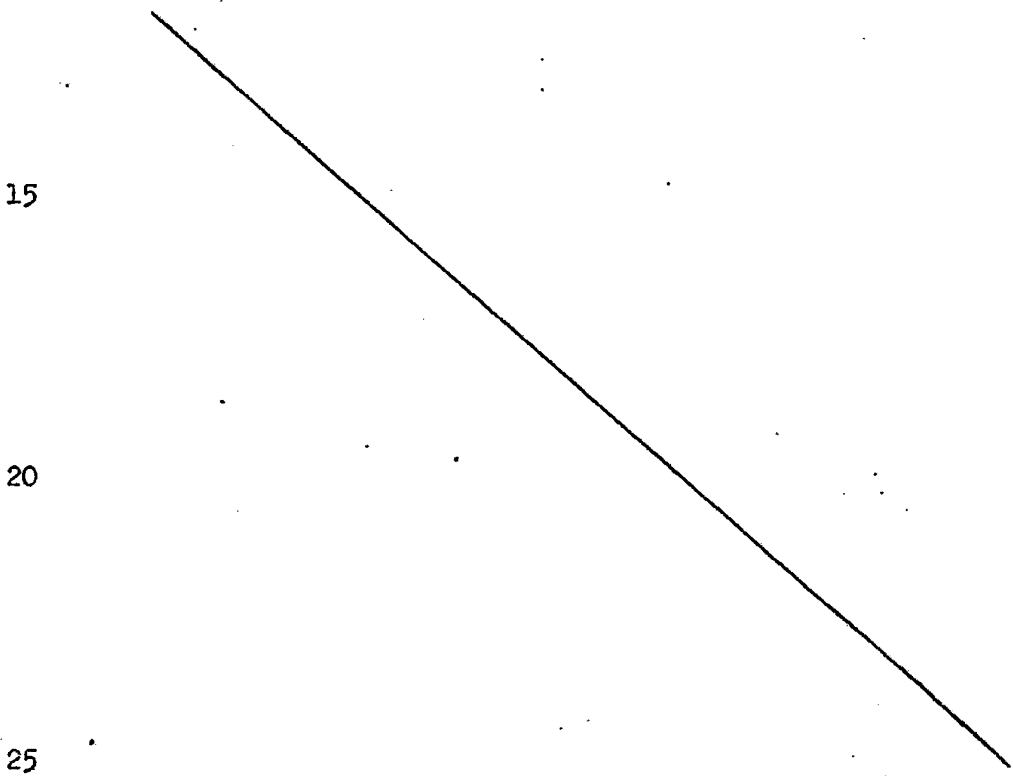
5 Cada una de las cavidades interiores 10, 10'... 90, 90' y A, A'... E, E' fueron cargadas con reactivo de anticuerpo (descrito en lo que sigue). El disco 110 cargado como se ha descrito anteriormente, se aceleró rápidamente en el aparato de la figura 1, hasta una primera velocidad tal que los contenidos 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
10 comenzó la reacción y transcurrió durante 30 minutos.
15



20 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
25 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-

ción de T-4-¹²⁵I 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 columnas 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.



TABLA

	<u>Tubo correspon-</u> <u>diente a la po-</u> <u>sición</u>		<u>Seña-</u> <u>les/mi-</u> <u>nuto</u>	<u>Microgra-</u> <u>mos % T₄</u>
	a	0	7623	0
	a'	0'	7468	0
5	b	1	5398	2
	b'	1'	5496	2
	c	2	3194	6
	c'	2'	3307	6
	d	3	2235	12
	a'	3'	2325	12
10	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
15	3'	7'	4051	6,1
	4	8	4092	6,0
	4'	8'	3899	6,4
	5	9	3415	7,7
	5'	9'	3627	7,1
	6	10	4500	4,8
	6'	10'	4389	5,2
20	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
25				

Concentraciones "patrón" representados gráficamente en la figura 4.

Concentraciones desconocidas de las muestras clínicas, determinadas a partir de la gráfica de la figura 4.

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-¹²⁵I (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

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

5 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

10 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).

25 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"

5 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:

<u>Tubo</u> <u>Nº</u>	<u>Adición de</u> <u>tampón de</u> <u>barbital</u>	<u>Elimina</u> <u>ción del</u> <u>tampón</u>	<u>Adición de</u> <u>reserva</u> <u>T-4</u>	<u>Concentra</u> <u>ción final</u>
10 1	1,0 ml	0 micro- litros	0 micro- litros	0 micro- gramos/ml
2	1,0 ml	10 micro- litros	10 microli- tros de reserva T-4 dilui- da a 3 ve- ces su vo- lumen	2 micro- gramos/ml
15 3	1,0 ml	10 micro- litros	10 micro- litros	6 micro- gramos/ml
4	1,0 ml	20 micro- litros	20 micro- litros	12 micro- gramos/ml
5	1,0 ml	50 micro- litros	50 micro- litros	30 micro- litros/ml

20 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

25

mezcla a fondo. Los resultados finales serán:

<u>Tubo Nº</u>		<u>T-4 nano-gramos/ml</u>	<u>T-4 nano-gramos/35 microlitros</u>	<u>T-4 nanogramos/100 ml</u>
	1	a	0	0
5	2	b	20	0,7
	3	c	60	2,1
	4	d	120	4,2
	5	e	300	10,5

Congelar en partes alícuotas de 0,5 ml.

10

F. Solución de tiroxina I¹²⁵

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

15

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

20

25

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 microlitros de solución T-4-¹²⁵I, 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 transcurre 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-

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.

5

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.

15

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

25

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 se
5 paración 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 cuan-
do continúe la rotación, no se producirá más cantidad
10 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 de-
signación del enzima, se "fija" al mismo tiempo esen-
cialmente para todas las muestras que están siendo ana-
15 lizadas. Esta realización es particularmente ventajosa
en aplicaciones tales como los ensayos cinéticos que im-
plican la determinación en una muestra de hormonas ti-
roideas, hormonas sexuales, glicósidos cardíacos, vita-
minas, antígenos del cáncer, utilizando reactivos patrón
20 para ensayos de radioinmunidad.

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

yente al gel cromatográfico 200'. En estas condiciones A y B pueden continuar reaccionando y produciendo cantidades adicionales de C. Sin embargo, al transferir el 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 pa
rámetro 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
5 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 in-
vención, con referencia a la figura 6, se emplea un disco
10 510, 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 fi-
gura 6, se colocan en las cavidades 520 cantidades preci-
15 sas de dos o más reaccionantes, por ejemplo suero y reac-
tivo indicados por 525, cavidades en las que tiene lugar
una reacción para proporcionar un producto de reacción fi-
sicamente separable. La carga de las cavidades 520 puede
ser efectuada pipeteando, como se ha descrito anteriormen-
20 te. 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
25 para hacer que los contenidos de las cavidades 520 sean
transferidos por la fuerza centrífuga a los medios de se-

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 simultáneos 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:

5 1ª.- Un método para analizar una pluralidad de muestras líquidas que comprende (i) proporcionar un material líquido en una pluralidad de primeras cavidades dispuestas de manera sustancialmente circular, (ii) proporcionar un material líquido diferente, susceptible de reaccionar con dicho material en dichas primeras cavidades, en una pluralidad de segundas cavidades dispuestas de manera sustancialmente circular, y (iii) proporcionar una pluralidad de medios de separación de fases líquidas en una disposición sustancialmente circular, estando dispuestas dichas primeras y segundas cavidades y dichos medios de separación de fases líquidas de manera sustancialmente concéntrica alrededor de un eje común, estando dichos medios de separación de fases líquidas a una distancia radial superior a la de dichas segundas cavidades y estando dichas segundas cavidades a una distancia radial superior a la de dichas primeras cavidades, estando dichos medios de separación de fases líquidas en una comunicación en tándem con una segunda cavidad que está en comunicación en tándem con una primera cavidad; (iv) provocar la rotación de dichas cavidades alrededor de dicho eje común para desarrollar una fuerza centrífuga suficiente para hacer que el líquido de dichas primeras ca-

10

15

20

25

vidades sea transferido a dichas segundas cavidades para que reaccione con dicho líquido en dichas segundas cavidades y produzca por lo menos un producto de reacción, (v) provocar subsiguientemente la rotación de dichas cavidades y de dichos medios de separación de fases líquidas a una velocidad que desarrolle una fuerza centrífuga suficiente para transferir los contenidos de líquido de dichas segundas cavidades a dichos medios de separación de fases líquidas, (vi) continuar la rotación de dichos medios de separación de fases líquidas para desarrollar una fuerza centrífuga suficiente para separar el líquido transferido a ellos en dos fases por lo menos, y (vii) medir, por lo menos, una propiedad de, por lo menos, una de dichas fases.

2ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que por lo menos uno de dichos materiales líquidos contiene un constituyente radiactivo y la propiedad medida en la operación (vii) es la radiactividad.

3ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que la transferencia de los contenidos de dichas segundas cavidades a dichos medios de separación de fases líquidas, tiene lugar en un momento en el que se están formando cantidades crecientes de un producto de reacción, por lo menos.

4ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación

ción 1ª, en el que por lo menos una de dichas fases separadas en dichos medios de separación de fases líquidas, se transfiere desde dicho medio de separación de fases líquidas, mediante la fuerza centrífuga desarrollada por la rotación de dichos medios rotatorios.

5
10
15
20
25

5ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que por lo menos una de dichas fases separadas en dichos medios de separación de fases líquidas, se transfiere desde dichos medios de separación de fases líquidas a un recipiente en comunicación con ellos, mediante la fuerza centrífuga.

6ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que se introduce un líquido en, por lo menos, dichas segundas cavidades subsiguientemente a la transferencia de líquido a dichos medios de separación de fases líquidas y durante la rotación de los mismos, para proporcionar un eluyente en dichos medios de separación de fases líquidas por transferencia a ellos mediante la fuerza centrífuga.

7ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que por lo menos una de dichas primeras cavidades y una de dichas segundas cavidades, contienen materiales líquidos, los cuales proporcionan al reaccionar, un valor definitivo de una propiedad mensurable en por lo menos una de dichas fases separadas.

8ª.- Un método para analizar una pluralidad de muestras líquidas, que comprende (i) proporcionar medios rotatorios que tienen, en relación rotatoria con ellos, una pluralidad de primeras y segundas cavidades, estando destinada cada una de dichas cavidades a contener líquido y estando dispuestas dichas cavidades en comunicación una con la otra, de tal manera que al desarrollar una fuerza centrífuga suficiente por la rotación de dichos medios rotatorios, el líquido de dicha primera cavidad se transfiere a dicha segunda cavidad y, al desarrollar una fuerza centrífuga suficiente por la rotación de dichos medios rotatorios, el líquido de dicha segunda cavidad es transferido fuera de dicha segunda cavidad, (ii) proporcionar por lo menos un material líquido en una pluralidad de dichas primeras cavidades y por lo menos un material líquido diferente en una pluralidad de dichas segundas cavidades, siendo dichos materiales tales que, por contacto entre sí, tiene lugar una interacción para proporcionar en dichas segundas cavidades una mezcla que tiene por lo menos un constituyente separable capaz de ser separado de dicha mezcla por medios de separación de fases líquidas (iii) provocar la rotación de dicho miembro rotatorio para desarrollar una fuerza centrífuga suficiente para transferir los contenidos de líquido de dichas primeras cavidades a las segundas cavidades, para poner

en contacto los contenidos de líquido de las segundas cavidades para que proporcionen una mezcla confinada en dicha segunda cavidad que contiene por lo menos un constituyente separable capaz de ser separado de dicha mezcla mediante medios de separación de fases líquidas (iv) proporcionar medios de separación de fases líquidas en comunicación con dichas segundas cavidades y dispuestos de manera que puedan entrar en rotación con ellos y ser sometidos a las fuerza centrífuga desarrollada por la rotación de dichos medios rotatorios, (v) ajustar la velocidad de los medios rotatorios, en un momento subsiguiente a la formación de dicho constituyente separable en dichas segundas cavidades, hasta el grado de que se proporcione allí una fuerza centrífuga suficiente para transferir la mezcla de dichas segundas cavidades a dichos medios de separación de fases líquidas, (vi) continuar la rotación de dichos medios rotatorios para proporcionar una fuerza centrífuga que actúe sobre la mezcla transferida a dichos medios de separación de fases líquidas, suficiente para hacer que dicha mezcla sea separada en dos fases por lo menos conteniendo una de dichas fases por lo menos uno de dichos constituyentes separables de dicha mezcla, y (vii) medir por lo menos una propiedad de dicha fase que contiene por lo menos uno de dichos constituyentes separables.

9^e.-- Un método de acuerdo con la reivindicación

8ª, en el que (i) por lo menos uno de dichos materiales líquidos proporcionados en dicha primera cavidad, contiene por lo menos un constituyente reactivo; (ii) por lo menos uno de dichos materiales líquidos proporcionados en
5 dicha segunda cavidad, contiene por lo menos un constituyente reactivo, (iii) dichos constituyentes reactivos, por transferencia de los contenidos líquidos de dicha primera cavidad, proceden a reaccionar en dicha segunda cavidad con formación de un producto de reacción, (iv) una por
10 lo menos de dichas dos fases separadas en dichos medios de separación de fases líquidas contiene sustancialmente la totalidad de por lo menos uno, pero no todos, de dichos constituyentes reactivos de dicha mezcla transferida a dichos medios de separación de fases líquidas.

15 10ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 8ª, en el que por lo menos uno de dichos líquidos contiene un constituyente radiactivo y la propiedad medida en la operación (vii) es la radiactividad.

20 11ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 9ª, en el que por lo menos uno de dichos constituyentes susceptibles de reaccionar es radioactivo.

25 12ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 9ª, en el que la transferencia de los contenidos de la segunda cavidad a dichos medios de separación de fases líquidas, tiene lugar en un momento en el que los cons-

tituyentes reactivos están reaccionando con formación de cantidades crecientes de producto de reacción.

5 13ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 8ª, en el que por lo menos una de dichas fases separadas en dichos medios de separación de fases líquidas, es transferida desde dichos medios de separación de fases líquidas, por la fuerza centrífuga desarrollada por la rotación de dichos medios rotatorios.

10 14ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 8ª, en el que por lo menos una de dichas fases separadas en dichos medios de separación de fases líquidas, es transferida desde dichos medios de separación de fases líquidas a un recipiente en comunicación con ellos, por la fuerza centrífuga desarrollada por la rotación de dichos medios rotatorios.

15 15ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 14ª, en el que dicha fase transferida a dicho recipiente es radiactiva.

20 16ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 14ª, en el que se mide por lo menos una propiedad de dicha fase transferida a dicho recipiente.

25 17ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 8ª, en el que por lo menos una de dichas primeras cavidades y una de dichas segundas cavidades contiene materiales líquidos que proporcionan al reaccionar un valor de-

finitivo de una propiedad mensurable en, por lo menos, una de dichas fases separadas.

5 18ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 8ª, en el que se introduce un líquido en por lo menos dichas segundas cavidades, subsiguientemente a la transferencia de líquido a dichos medios de separación de fases líquidas, y durante la rotación de los mismos, para proporcionar un eluyente en dichos medios de separación de fases líquidas, por transferencia a 10 ellos mediante la fuerza centrífuga.

19ª.- Un método 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 15 y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de cuarenta hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 11.DIC.1976

P.A.

Alberto de Elzaburu
Per. Pagar.

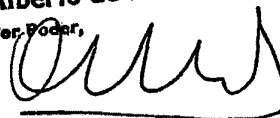
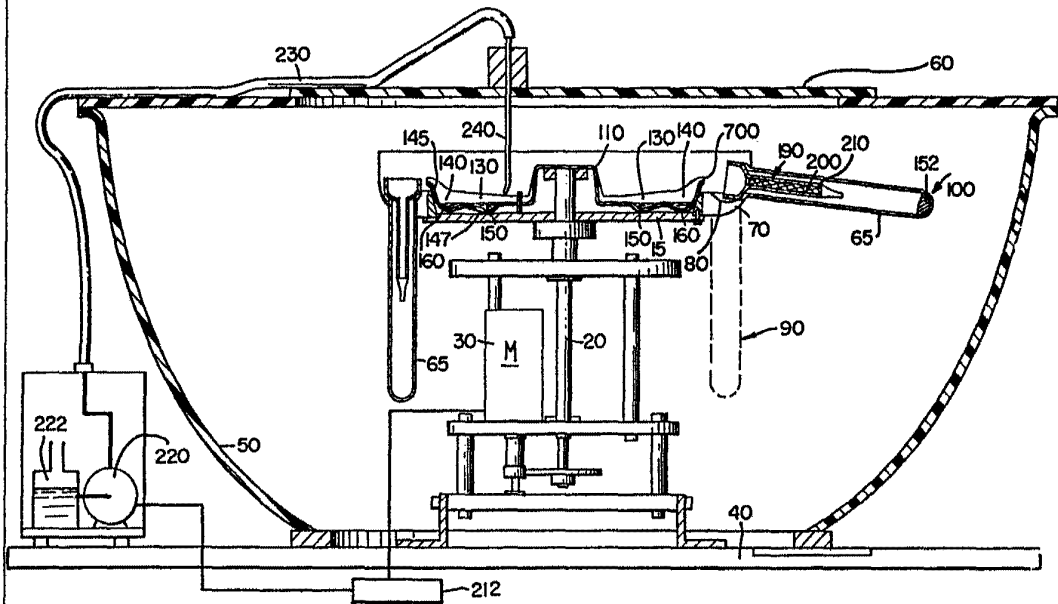


FIG. 1



Alberto de Elzaburu
Por Poder,

FIG. 2

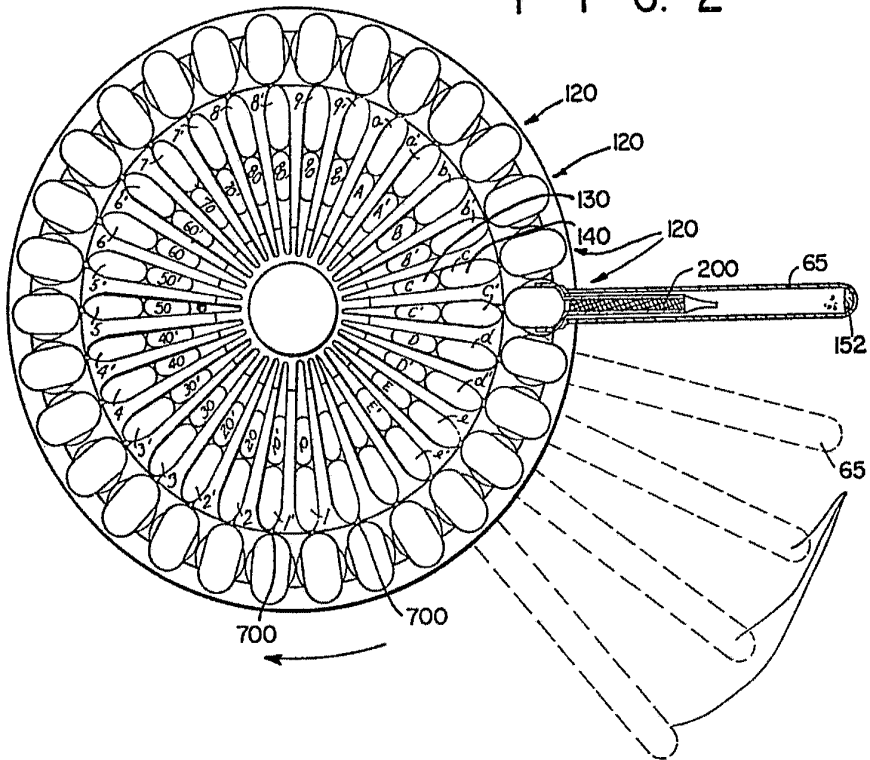
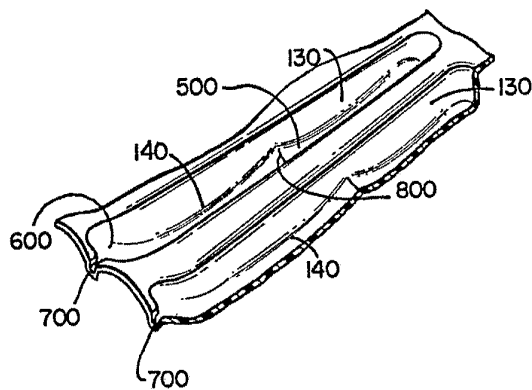
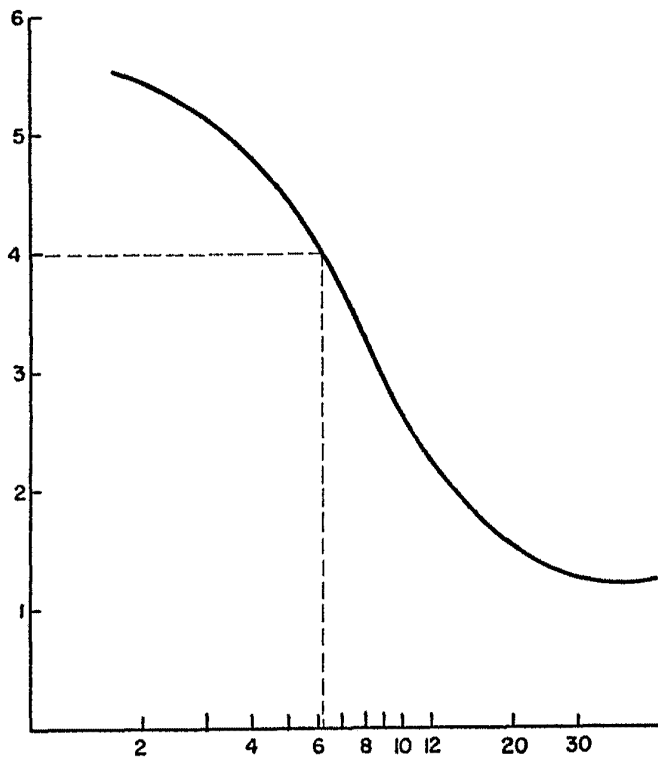


FIG. 2a



Alberto de Elizaburu
For Poder

F I G. 4



Alberto de Elzaburu
Por Poder

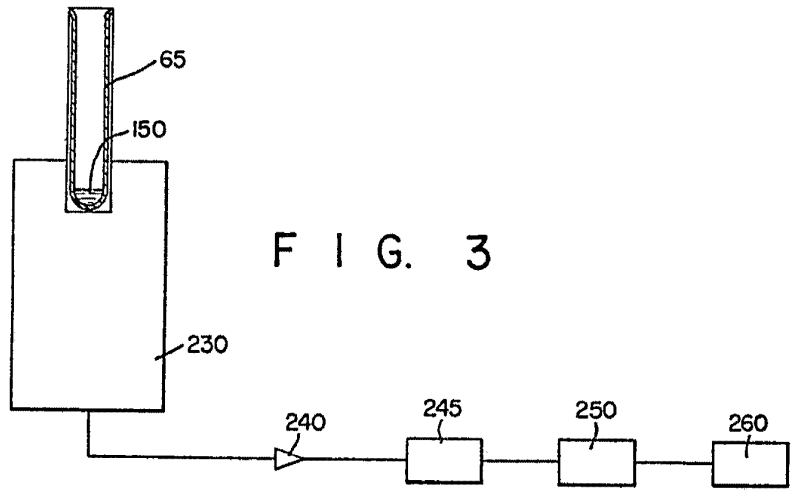


FIG. 3

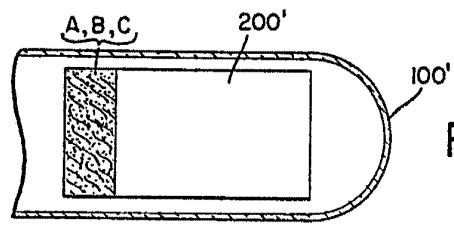


FIG. 5a

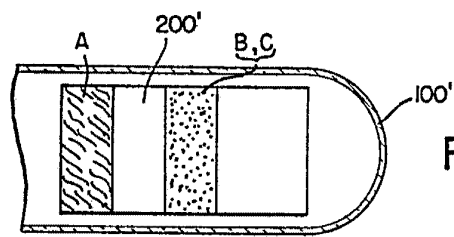


FIG. 5b

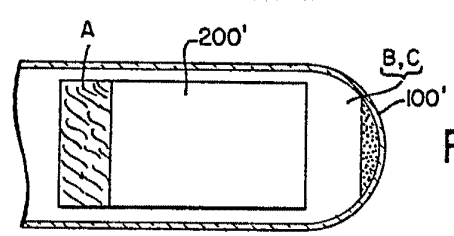
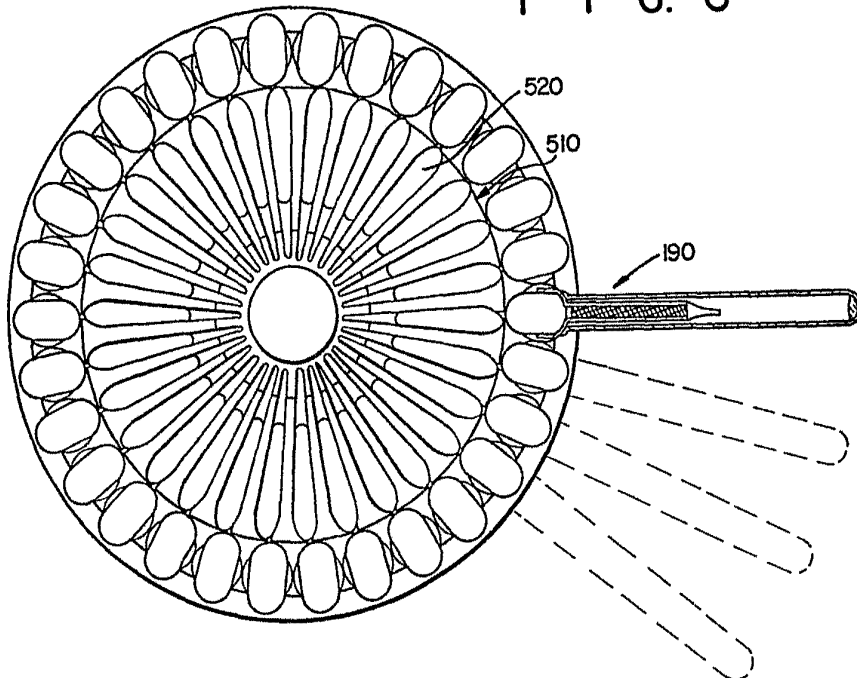


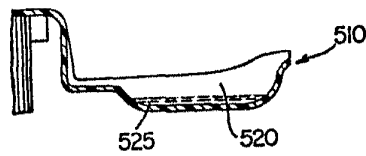
FIG. 5c

Alberto de E. ...
Per Podar,

F I G. 6



F I G. 6a



Alberto da Silva
Per Podda