

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



10	ES	11	NUMERO	10	A 1
		21	457.114		
		22	FECHA DE PRESENTACION		
			23-3-1977		

PATENTE DE INVENCION

P.- 65.471
HOE 76/F 057

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
31	NUMERO				
	P 26 13 294.5		29-3-76		R.F.A.

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

64	TITULO DE LA INVENCION
	"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN REACTIVO ACABADO PARA DETERMINACIONES RADIOINMUNOLOGICAS"

71	SOLICITANTE (S)
	HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT

	DOMICILIO DEL SOLICITANTE
	D-6230 Frankfurt/Main 80, República Federal Alemana

72	INVENTOR (ES)
	Dr. Hans Georg Eckert y Ellen Weilbacher

73	TITULAR (23)

74	REPRESENTANTE
	DON FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ

1 Para la determinación radioinmunológica de sustan
cias biológicamente activas, es necesario que dos o más com
ponentes reaccionen, sólo en el momento de su utilización, en
tre sí y con terceras sustancias añadidas, por ejemplo una
5 muestra de plasma o de suero. La reacción hasta la saturación
o hasta el establecimiento de un equilibrio entre un anti-
cuerpo específico y la forma radioactiva de la sustancia a
determinar, añadida en exceso, es en este caso independien-
te de la cantidad de sustancia que se encuentra en la mues-
tra a determinar (principios del análisis competitivo de fi-
10 jación de proteínas y del análisis de dilución isotópica).

 Para evitar una reacción que transcurra de manera
prematura, parcialmente irreversible, que haga inexacta una
determinación, es usual conservar los componentes individua
15 les de reacción en forma sólida, líquida o liofilizada en am-
pollas o en pequeños frasquitos. Sólo en el momento del em-
pleo, se disuelve su contenido según una receta de trabajo
establecida y se juntan cantidades definidas de estas solu-
ciones.

20 Según la DT-OS 2.123.210, es conocido introducir
en un recipiente ambos componentes y someterlos a un secado
por congelación(liofilización).

 Según la DT-OS 2.261.544, es conocido verter am-
bos componentes, uno detrás de otro, y congelarlos, así co-
25 mo someterlos luego conjuntamente a un secado por congela-

1 ción.

5 Se ha encontrado ahora un procedimiento para la
preparación de un reactivo acabado para determinaciones ra-
dioinmunológicas, que se caracteriza porque la solución de
la forma de la sustancia biológicamente activa a determinar,
marcada con radioactividad, y la solución del antisuero es-
pecífico, se introducen, al mismo tiempo, o en forma de mez-
cla, en un recipiente, convenientemente en un tubito de en-
sayo, e inmediatamente después se congelan, o porque ambas
10 soluciones se introducen, una detrás de otra, en un tubito
de ensayo e inmediatamente después se congelan. Es ventajo-
so enfriar las soluciones, antes de la incorporación, hasta
una temperatura comprendida entre 0 y 4°C (con hielo/agua).

15 La congelación tiene lugar, preferentemente, en
nitrógeno líquido. Seguidamente, las soluciones congeladas
se liofilizan, sin descongelar en el intermedio. Ventajosa-
mente, se liofiliza a una temperatura comprendida entre -5
y -40°C y a una presión comprendida entre 0,5 y 0,001 Torr,
durante aproximadamente 24 horas.

20 Dependiendo de la concentración necesaria pueden
ciertamente reaccionar ligeramente entre sí ambos componen-
tes. La reacción entre ellos se puede reducir, sin embargo,
a menos de 1% y en la realización de la determinación care-
ce de importancia que la mezcla previamente enfriada se con-
gele rápidamente.
25

1 Para la realización de la determinación de una sus-
tancia biológicamente activa, se introduce en el tubito de
ensayo con el reactivo acabado, la muestra de un líquido bio-
lógico a determinar, preferentemente en una cantidad de 20
5 a 200 microlitros, dependiendo de la concentración de la sus-
tancia activa.

 En otro tubito de ensayo se añade la solución pa-
trón con un contenido conocido de la sustancia biológicamen-
te activa de que se trate.

10 Para reponer el agua retirada mediante el secado
por congelación, se añade la cantidad correspondiente - igual
a la cantidad de agua utilizada inicialmente para la prepa-
ración del reactivo acabado - a saber, por separado o en mez-
cla con el líquido biológico.

15 La determinación ulterior se realiza de manera co-
nocida (véase G. Pincus, K. V. Thimann y E. B. Aswood "The
Hormones, Physiology, Chemistry and Applications", Academic
Press New York, London 1964, páginas 557 y siguientes).

20 De esta manera pueden prepararse tubitos de ensayo
con reactivo acabado para determinaciones radioinmunológicas
e inmunorradiométricas, para las siguientes sustancias bioló-
gicamente activas:

25	Tirotropina	(TSH)
	Tiroxina	(T4)
	Triyodotironina	(T3)

1	Alfafetoproteína	(AFP)
	Insulina	
	Glucagón	
	Hormona del crecimiento	(GH)
5	Hormona folículoestimulante	(FSH)
	Hormona luteinizante	(LH)
	Lactógeno de placenta	(PL)
	Gonadotropina coriónica	(CG)
	Estrógenos	
10	Gestágenos	
	Andrógenos	
	Prostaglandinas	
	Vitaminas	
	Medicamentos, por ejemplo digoxina/digitoxina	
15	Los tubitos de ensayo con reactivo acabado, tal como se preparan mediante estos dos procedimientos de llenado así como de congelación y liofilización, disminuyen de manera muy considerable el trabajo del usuario, en comparación con otros reactivos que se encuentran en el mercado.	
20	Además del ahorro de tiempo y de la exclusión de fuentes de error, debido a la supresión de muchas etapas de disolución, dilución y pipeteado, se reduce también a un mínimo la manipulación al aire libre con la sustancia marcada con radioactividad. Además de estas ventajas, se ahorra también al usuario la preparación de un tampón, incluido su ajuste de pH.	
25		

1 Además, se mejora la exactitud del procedimiento, puesto
que el fabricante, con dispositivos de pipeteado que traba-
jan automáticamente, puede envasar las soluciones con un
error de medición o aforo inferior a 1%.

5 Una ventaja más del tubito de ensayo con reactivo
acabado, que aquí se describe, es el óptimo aprovechamiento
de un estuche o equipo radioinmunológico. Mientras que con
los equipos anteriores, el material en forma disuelta no uti-
lizado debido a un número de muestras de ensayo demasiado pe-
10 queño, no es la mayor parte de las veces estable y, por ello,
se desecha, los componentes aislados y liofilizados en tubi-
tos de ensayo, son estables y pueden ser utilizados también
en un momento posterior.

15 Es ventajosa, especialmente, la introducción simul-
tánea de los componentes individuales en el tubito, puesto
que solamente es necesaria una etapa de trabajo.

No obstante, también es ventajosa la introducción
sucesiva de los componentes, porque, al igual que en la in-
troducción simultánea, el enfriamiento no tiene lugar hasta
20 después de que se ha completado la introducción. De este mo-
do, se pueden evitar adherencias de los componentes a la pa-
red interior del tubito. Además, no existe el peligro de que
la punta de la pipeta de envasado se congele, como es de te-
mer en el caso de la introducción con enfriamiento simultá-
neo.
25

1 Para la utilización ulterior se presenta ya una
mezcla homogénea, que mediante adición de agua o de líquido
biológico se puede transformar rápidamente y sin gasto, en
una solución homogénea.

5 Ejemplo de realización 1

Preparación de tubitos de ensayo para determinación de tri-
yodotironina (T3)

10 En tubitos de ensayo de poliestireno, con una capi-
da de 3 a 4 ml, se introducen simultáneamente 200 microlit-
tros de solución tampón de barbital, enfriada con hielo/agua,
de pH 8,6, que contienen aproximadamente 30 pg de T3 marcado
con ^{125}I con aproximadamente 20.000 Ipm en albúmina de sue-
ro de vacuno, y 200 microlitros de la solución, también en-
friada, del antisuero diluido con tampón de barbital en la
15 proporción de 1:20.000.

Ya durante la confluencia de ambas soluciones frías,
se congela la mezcla con nitrógeno líquido, para evitar cual-
quier reacción. Los tubitos de ensayo con la mezcla de reac-
ción, se secan después por congelación, sin que el conteni-
do pueda descongelarse en el intermedio. En los productos
20 liofilizados obtenidos de este modo, no tiene lugar ninguna
reacción entre ambos componentes. Los productos liofilizados
cerrados con tapones son utilizables durante más de 6 semanas.

Realización de la determinación

25 En el momento de la determinación de T3, se añaden

1 a tubitos de ensayo con reactivo acabado, preferiblemente
con un aparato dilutor, en una sola operación o sucesivamen
te, por ejemplo con pipetas de Eppendorf, exactamente 100
5 microlitros de suero del paciente y 400 microlitros de agua
bidestilada. Existe también la posibilidad de diluir el sue
ro del paciente con agua bidestilada en proporción 1:5, y
añadir 500 microlitros de esta solución diluida, al tubito
de ensayo. De igual manera, para el trazado de la curva de
10 calibrado, se pipetea también las diversas soluciones patrón
de hormonas, en los tubitos con reactivo acabado.

Para disolver totalmente los productos liofiliza-
dos y homogeneizar bien la mezcla de incubación, el conteni-
do de cada uno de los tubitos de ensayo se mezcla intensa-
mente (Whirl mix), inmediatamente después de adición de las
15 soluciones. Todas las formulaciones de ensayo se realizan, de
la manera más conveniente, tres veces, pero por lo menos dos
veces.

Los tubitos de ensayo se mantienen cerrados a la
temperatura ambiente (20-30°C), durante 4 horas para que
20 reaccionen, después se les añade a cada uno de ellos 1 ml
de una solución al 24% de polietilenglicol (grado de poli-
merización 6.000), se mezclan intensamente (Whirl mix) y el
precipitado formado se separa por centrifugación durante 10
minutos, a por lo menos $1.500 g \sqrt{g}$ = aceleración de la gra-
25 vedad. La solución que sobrenada se decanta cuidadosamente,

1 los recipientes se colocan con su abertura sobre una base
de celulosa, para que escurran, y, finalmente, se mide la
radioactividad de los residuos en el dispositivo cambiador
de muestras del contador de rayos gamma, durante 1 minuto.

5 Se forman las medias aritméticas de los impulsos
por minuto para la totalidad de las determinaciones triples,
y aquéllas se contrastan con la concentración patrón corres-
pondiente. No obstante, también es posible expresar la por-
ción de hormona fijada a anticuerpos en porcentaje, midiendo
10 al principio en un número representativo de tubitos de en-
sayo (aproximadamente 3 a 5 piezas) la radioactividad total.
En esta curva se puede leer directamente en ng/ml, con el
número de impulsos encontrado, el contenido de T3 de una
muestra de suero.

15 Ejemplo de realización 2

Preparación de tubitos de ensayo para hormona del crecimien-
to (hGH)

20 En tubitos de ensayo de poliestireno, con una ca-
bida de 3 a 4 ml, se introducen sucesivamente 200 microli-
tros de solución tampón de fosfato, enfriada con hielo/agua,
de pH 7,4, que contienen aproximadamente 500 pg de hGH mar-
cada con ^{125}I , estabilizada con aproximadamente 20.000 Ipm
en albúmina de suero de vacuno, y 200 microlitros de la solu-
ción, igualmente enfriada, del antisuero diluido con tampón
25 de fosfato en la proporción de 1:120.000.

1 Tan pronto como se han mezclado en el tubito de
ensayo estas dos soluciones frías, se congelan éstas con ni-
trógeno líquido, para evitar una reacción. Los tubitos de en-
sayo con la mezcla de reacción se secan luego por congelación,
5 durante 24 horas, a -20°C y a 0,2 - 0,1 Torr, sin que el con-
tenido pueda descongelarse en el intermedio. En los produc-
tos liofilizados obtenidos de este modo, no tiene lugar nin-
guna reacción entre ambos componentes. Los tubitos de ensa-
yo con los liofilizados, cerrados con tapones, son utiliza-
10 bles durante más de 4 semanas.

Realización de la determinación: Variante A

Como se ha indicado en el ejemplo de realización
1, para la determinación de hGH, se provoca también la reac-
ción mediante adición de 100 microlitros de muestra o de 100
15 microlitros de solución patrón, y de 400 microlitros de agua
bidestilada. Para disolver totalmente los productos liofili-
zados y homogeneizar bien la mezcla de incubación, el conte-
nido de cada uno de los tubitos de ensayo se mezcla intensa-
mente inmediatamente después de la adición. Todas las for-
20 mulaciones de ensayo se realizan tres veces, pero por lo me-
nos dos veces.

Las formulaciones de ensayo se mantienen, tapadas,
durante 18 a 24 horas a la temperatura ambiente (20 a 30°C).
Para separar la hGH combinada y la libre, se añaden después,
25 a cada formulación de ensayo, 0,5 ml de una suspensión que

1 contiene un denominado segundo anticuerpo copulado con celu-
losa. Al cabo de 3 a 5 horas de volteo por rotación por la
parte superior con aproximadamente 20 a 30 revoluciones por
5 minutos a por lo menos 1.500 g y, seguidamente, el líquido que
sobrenada se separa del sedimento por succión. El residuo de
celulosa se lava seguidamente con 2,5 ml de tampón, se cen-
trifuga de nuevo, se extrae por succión y se mide la radioac-
tividad.

10 Con muestras patrón, que se han tratado en condi-
ciones idénticas, se trata una curva de calibrado y, a par-
tir de ella, se deduce el contenido de la muestra desconoci-
da.

Variante B

15 Puesto que el tubito de ensayo contiene ya los com-
puestos de reacción necesarios para la determinación de hGH,
la reacción se puede provocar también solamente mediante adi-
ción de 100 microlitros de la muestra o de 100 microlitros
de una solución patrón. En contraposición con la variante A,
20 en este caso no se repone el agua retirada por liofilización.
Para disolver totalmente los productos liofilizados con es-
tos 100 microlitros de líquido y homogeneizar bien la mezcla
de incubación, debe mezclarse intensamente. En tal caso deben
disolverse totalmente todas las partículas de producto liofi-
25 lizado. Debido al volumen de reacción, muy pequeño, la reac-

1 ción transcurre esencialmente con mayor rapidez que la que
se ha indicado en la variante A, de manera tal que se pue-
de iniciar ya al cabo de 5 horas el tratamiento descrito.

5

REIVINDICACIONES

10

Los puntos de invención propia y nueva que se pre-
sentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de
15 Invención en España, por VEINTE años, son los que se reco-
gen en las reivindicaciones siguientes:

1ª.- Procedimiento para la preparación de un reac-
tivo acabado para determinaciones radioinmunológicas, carac-
terizado porque la solución de la forma de la sustancia bio-
20 lógicamente activa a determinar, marcada con radioactividad,
y la solución del antisuero específico, se introducen en un
recipiente, simultáneamente o en forma de mezcla, e inmedia-
tamente después se congelan, o se introducen, una detrás de
otra, en un recipiente, e inmediatamente después se conge-
25 lan.



1

2ª.- Procedimiento para la preparación de un reactivo acabado según la reivindicación 1ª, caracterizado por que la mezcla se seca por congelación, sin descongelar.

5

3ª.- PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN REACTIVO ACABADO PARA DETERMINACIONES RADIOINMUNOLOGICAS.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

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

10

Madrid, 16 JUL 1977

P.A.

Fernando de Elizaburo
Por Poder



15

20

25

TGG.

