



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

19 ES	11 NUMERO	10 A1
	21	458.411
	22 FECHA DE PRESENTACION	
		3-5-77

6 NOV. 1978

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	53 PAIS
31 NUMERO		
682.807	3-5-76	ESTADOS UNIDOS
682.808	3-5-76	ESTADOS UNIDOS
682.830	3-5-76	ESTADOS UNIDOS

47 FECHA DE PUBLICIDAD	61 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G01N	

54 TITULO DE LA INVENCION
UN METODO Y UN APARATO INMUNOQUIMICO DE SEPARACION DE FRACCIONES LIBRES DE LAS COMBINADAS EN UN PROCESO DE INMUNOANALISIS.

71 SOLICITANTE (S)
BECKMAN INSTRUMENTS, INC.
73 DOMICILIO DEL SOLICITANTE
2500 Harbor Boulevard - Fullerton - California - Estados Unidos
72 INVENTOR (ES)
ALAN J. POLITO y WILLIAM S. KNIGHT, ambos de nacionalidad estadounidense.
73 TITULAR (ES)
El mismo solicitante.
74 REPRESENTANTE
D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU

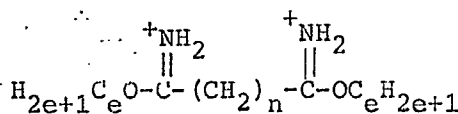
1

RESUMEN DE LA INVENCION

Un método mejorado de separación de fracciones libres de fracciones combinadas en un proceso de inmunoanálisis del tipo en el que se pone en contacto una solución con un compuesto constituido por una matriz polisacárida derivatizada, covalentemente copulada con un anticuerpo por un agente copulante bifuncional, donde la mejora consiste en seleccionar dicho agente copulante bifuncional entre un grupo formado por:

5

10



donde n es un número entero de 1 a 6 y e es un número entero de 1 a 2.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

1. Campo de la invención

Esta invención se refiere a un método de preparación de fracciones libres de las combinadas en un proceso de inmunoanálisis y a un nuevo combinado inmunológico para uso en el mismo.

20

2. Descripción de la técnica anterior

25

El radioinmunoanálisis (RIA) en fase sólida ha adquirido popularidad debido a que el sistema en el que puede conseguirse en una sola etapa la reacción antígeno-anticuerpo y la separación del antígeno libre del combinado no solamente permite realizar un RIA sencillo y rápido sino que también elimina un gran número de errores de manipulación y otros que son inherentes a otras técnicas de separación. Catt y colaboradores, Biochem. J., 100: 31c (1966), utilizaron en principio como materiales en fase sólida los polímeros pulverizados que contenían grupos tiocianato reactivos (-N=C=S) capaces de formar enlaces covalentes con los anticuerpos. Los

30

1 anticuerpos copulados a las partículas de dextrano y celu-
losa activadas con bromuro de cianógeno se pusieron de mo-
da como resultado del trabajo de Wide, Porath y Axen
5 {Wide y colaboradores, Biochem. Biophys. Acta, 130: 257
(1966), Axen y colaboradores, Nature (London) 214: 1302
(1967) y Wide, Acta Endocrinol. (Copenhagen), Suppl. n° 142:
207 (1969)}. Alternativamente, Ternynck y colaboradores,
F.E.B.S. Letts. 23: 24 (1972), utilizaron glutaraldehido
10 como reactivo bifuncional en dos etapas para copular anti-
cuerpos a los grupos amida de la poliacrilamida.

Se ha establecido bien que la eficiencia de los adscr-
bentes de afinidad aumenta considerablemente cuando se intro-
ducen separadores hidrocarbonados para separar el ligando
de la matriz sólida {Cuatrecasas y colaboradores, Proc. Nat.
15 Acad. Sci. U.S., 61: 636 (1968)}. Se cree que el separador
aumenta la flexibilidad y la movilidad del ligando permi-
tiendo el acceso sin impedimentos de la proteína al ligando.
Armados con estos conocimientos, Cambiaso y colaboradores,
Immunochem., 12: 273 (1975), copularon las fracciones de
20 gamma-globulina a los derivados aminohexílicos activados
con glutaraldehido de la sefarosa-4B, como indica la Figu-
ra I y demostraron que este procedimiento producía útiles
immunosorbentes.

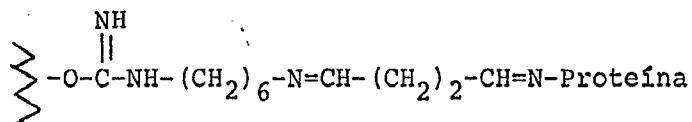


Figura 1

Queda por demostrar si los anticuerpos purificados o
el anticuerpo conteniendo fracciones de gamma-globulina co-
puladas a la sefarosa por este procedimiento resultarán más
30 eficiente para la fijación de antígenos que los mismos anti-

1

cuerpos copulados a la sefarsa mediante el método del bromuro de cianógeno. En este aspecto, Bolton y colaboradores, Biochemica et Biophysica Acta, 329: 318 (1973), informaron que la recuperación de la actividad del anticuerpo frente

5

a los haptenos y pequeños péptidos suele ser mayor en los preparados sólidos de antisueros activados con bromuro de cianógeno que en los preparados similares en fase sólida de antisueros frente a las hormonas proteicas de alto peso molecular (véase la Figura 2):

10

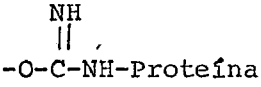


Figura 2

15

Aunque puede parecer razonable que los preparados de antisueros en fase sólida frente a grandes moléculas producidas por los procedimientos similares a los de Cambiaso y colaboradores, supra, pueden producir una mejor recuperación de la actividad de anticuerpos que los preparados sólidos producidos sin un brazo separador, hay dos inconvenientes en los procedimientos químicos utilizados en la actualidad para unir covalentemente los anticuerpos a las matrices sólidas. En primer lugar, en muchos casos, no está bien establecida la naturaleza exacta de las reacciones químicas y, en segundo lugar, los anticuerpos inmovilizados pueden ser unidos a la matriz sólida en una forma distribuída al azar y, por lo tanto, aumenta la posibilidad de copulaciones que implican un resto aminoácido "esencial".

20

25

Ya en 1959, Ludwig y colaboradores, Abst. 135th Meeting Am. Chem. Soc., 44c (1959), informaron sobre la reacción de imidoésteres sustituidos con grupos α - y ϵ -amino típicos de la glicilglicina y del ácido ϵ -aminocaproico para formar

30

1 amidinas (véase la Figura 3):

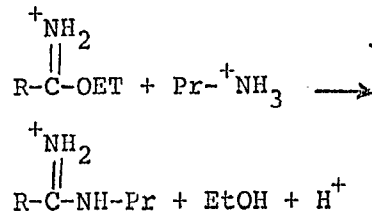


Figura 3

5 Estos autores establecieron que la reacción transcu-
rre rápidamente en una solución acuosa a pH aproximadamer-
te neutro, incluso a 1°C y bajo estas condiciones el reacti-
vo imidoéster no reacciona con los compuestos modélicos que
10 contienen grupos sulfhidrilo, grupos fenólicos, grupos imi-
dazol o enlaces péptidos. Además, observaron que la carga
neta del péptido permanece inalterada en casi todo el inter-
valo de pH, teniendo la función amidina un pK próximo a 12.

15 En 1963, Wofsky y colaboradores, Biochem., 2:104
(1963) amidinaron exhaustivamente varias proteínas y encon-
traron que la reacción era muy específica para los restos
de lisina. Además, informaron que una amidinación extensa
produce efectos notablemente poco detectables sobre la acti-
20 vidad biológica de los anticuerpos. Llegaron a la conclusión
de que la lisina no está críticamente implicada en los cen-
tros reactivos de cualquiera de los anticuerpos examinados
(anti-albúmina de suero bovino (anti-BSA), anti-bencenoarso-
nato, anti-acetato de D-benzoilaminofenilo, anti-SIII, anti-
25 DNP y anti- β -lactósido).

Más tarde, en 1966, Dutton y colaboradores, Biochem.
30 and Biophys. Res. Comm., 23:730 (1966), modificaron extensi-
vamente los anticuerpos anti-DNP con el agente reticulante
dihidrocloruro de malonimidato de dietilo y análogamente in-
formaron de la retención cuantitativa de la actividad anti-

1 ción fraccionada (es decir, sulfato amónico, polietilenglicol) y el método del anticuerpo doble. De acuerdo con Ratcliffe, Br. Med. Bull. 30:32 (1974), una técnica de separación ideal debería cumplir los siguientes criterios:

- 5 A. Debe separar por completo las fracciones libres y combinadas con un amplio margen de error en las condiciones utilizadas para la separación.
- B. Debe ser sencillo, rápido y económico y utilizar reactivos y equipos fácilmente asequibles.
- 10 C. No debe ser afectado por el plasma ni el suero.

15 Ratcliffe indica además que, para la aplicación clínica general, todas las manipulaciones deben ser realizadas en un solo tubo, deben adaptarse a la automatización y deben ser aplicables a una amplia gama de antígenos o haptenos (es decir, pequeños péptidos y esteroides así como proteínas de elevado peso molecular).

20 Aunque el método del doble anticuerpo para la separación de las fracciones libres y combinadas en los sistemas de radioinmunoanálisis (RIA) es actualmente una de las técnicas de separación más ampliamente empleadas y, bajo condiciones óptimas, satisface a la mayoría de los criterios mencionados anteriormente, presenta ciertos inconvenientes inherentes. Véase Ratcliffe, supra; Seki y colaboradores, Endocrinol. Japan, 20:121 (1973) y Koninckx y colaboradores, Acta Endocrinol., 81:43 (1976). Como debe agregarse una proteína portadora, se requieren grandes cantidades de anticuerpo precipitante selectivo y por lo tanto el método es caro.

25 El tiempo necesario para que la reacción de inmunoprecipitación llegue al equilibrio (24 a 48 horas a 4°C) es considerablemente largo. Finalmente, debido a la posibilidad de

30

1 interferencias no específicas por factores presentes en el
suero, las condiciones del análisis deben ser meticulosamen-
te evaluadas antes de establecer un sistema de análisis.

5 Uno de los principales inconvenientes en el uso de
los anticuerpos primarios en fase sólida en los sistemas
RIA es que, como resultado de la pérdida de título de anti-
cuerpo y de la avidéz que con frecuencia aparece durante la
etapa de copulación, deben ponerse a punto sistemas más
largos, más costosos y más complicados (es decir, análisis
10 secuenciales). (Zeltner y colaboradores, Clin.Chem., 20:5
(1974)). Recientemente, Den Hollander y colaboradores, J.
Immunol. Methods, 1:247 (1972), pusieron a punto un nuevo
método de separación empleando un segundo antisuero copula-
do a una matriz insoluble mediante bromuro de cianógeno y
15 denominaron a este método de preparación el método en fase
sólida con doble anticuerpo (DASP). Aunque en estos prepara-
dos sólidos casi con toda seguridad el título y la avidéz
del segundo anticuerpo se ha reducido, la reacción del anti-
cuerpo primario permanece inalterada y, por lo tanto, se
20 elimina uno de los principales inconvenientes de los siste-
mas en fase sólida. De hecho, el método DASP presenta las
siguientes ventajas sobre el método más convencional de doble
anticuerpo soluble de separación de fracciones libres y
combinadas:

- 25 A. Como los preparados sólidos de precipitación de anticuer-
pos requieren poca o ninguna proteína portadora, es nece-
sario una menor cantidad del segundo anticuerpo para pre-
cipitar al primer anticuerpo.
- 30 B. El método DASP necesita menos tiempo para producir la
separación completa de las fracciones libres y combinadas.

1 C. Desaparecen por completo las interferencias no específicas por factores presentes en el suero con la precipitación DASP si se trabaja en la zona de exceso de segundo anticuerpo. De hecho, una vez que se han establecido las
5 condiciones óptimas para la precipitación del complejo inmune, no es necesario comprobar frecuentemente.

A pesar de todas las ventajas obtenidas con los preparados sólidos para precipitar los anticuerpos, queda un inconveniente mecánico común a todos los análisis en fase sólida. En todos los análisis en fase sólida es necesario
10 agitar continuamente las sustancias reaccionantes, con el trabajo extra adicional de primero tapar el análisis y después centrifugar y destaparlo antes de la etapa de lavado. Chan y colaboradores, Am.Clin.Biochem., 12:173 (1975), copularon anticuerpos primarios a un gel de dextrano en forma de perlas, ultrafino, activado con bromuro de cianógeno, de la marca Sephadex G25 (con un tamaño de partícula inferior a 10 micras) e indicaron que, con pequeños volúmenes
15 de incubación (300 a 400 microlitros) era posible que la reacción del anticuerpo transcurriera sin necesidad de rotación vertical o de cualquier otro medio de agitación continua.

Actualmente se han unido covalentemente los anticuerpos a diversas matrices sólidas como agarosa, vidrio, poliacrilamida e incluso óxido de hierro en polvo. Siegel y colaboradores, J.Clin.Endocrinol. Metab., 37:526 (1973), Weetall, Chem.Abst., 77:18064y (1972), Moore y colaboradores, Steroids, 20:199 (1972) y Hersh y colaboradores, Clinica Chemica Acta, 63:69 (1975).
25

30 Aunque en principio el primer anticuerpo ligado a una

1 fase sólida constituye un proceso de separación sencillo
y versátil, aparecen varios inconvenientes en este método.
Las dos cuestiones que deben responderse en relación con
5 los sistemas en fase sólida que utilizan anticuerpos primarios
son, en primer lugar, la posible pérdida de actividad
del anticuerpo (título) con el consiguiente desperdicio del
valioso antisuero y, en segundo lugar, la posible reducción
de la sensibilidad que puede conseguirse con los sistemas
10 sólidos en comparación con la que puede conseguirse utilizando
los mismos antisueros en una solución acuosa. Como se ha
indicado anteriormente, Bolton y colaboradores, supra, indi-
caron que la recuperación de la actividad del anticuerpo so-
lía ser mayor en los preparados sólidos de antisueros para los
15 haptenos y pequeños péptidos que en los preparados sólidos
similares de antisueros para hormonas proteicas de peso mole-
cular grande. Análogamente, los antisueros de los haptenos
copulados covalentemente con las matrices sólidas presentan
poca o ninguna pérdida de sensibilidad de análisis cuando
se comparan con el sistema de anticuerpo no copulado mientras
20 que se produce una pérdida espectacular de sensibilidad cuando
se ensayan los anticuerpos de las grandes hormonas protei-
cas. Estos autores llegaron a la conclusión de que cualquier
pérdida de la sensibilidad de análisis resultante del uso
de antisueros químicamente ligados es probablemente causada
25 por impedimento estérico de los antígenos más grandes.

Por lo tanto, uno de los principales inconvenientes
contra el uso de preparados sólidos de anticuerpos primarios
en los sistemas RIA es que este método no es universal. (El
30 método no puede ser utilizado en igualdad de condiciones con
las moléculas grandes y las pequeñas). Otros inconvenientes

1 aplicables a todos los procesos de RIA en fase sólida pri-
maria son: es necesario pipetear una cantidad precisa de
anticuerpo a partir de una suspensión insoluble de gel, la
mezcla de análisis debe ser mecánicamente agitada para ga-
5 rantizar una mezcla apropiada y habitualmente es necesario
centrifugar para separar las fracciones libres y combinadas.

El uso de columnas de Sephadex en jeringas de plásti-
co para combinar una mezcla de tiroxina marcada con ^{125}I
(T_4) y T_4 liberada de las proteínas séricas por la acción
10 de los álcalis, seguido del subsiguiente análisis de proteí-
nas combinadas con una cantidad fija y limitante de globuli-
na combinatoria de tiroides (TBG) sobre cada columna ha si-
do introducido recientemente. Seligson y colaboradores, Clin.
Chem. Acta, 38:199 (1972) y Alexander y colaboradores, Clin.
15 Chem., 20:553 (1974). En este procedimiento, la columna de
Sephadex también sirve para separar la T_4 libre del comple-
jo T_4 -TBG. Se han puesto a punto ensayos similares para la
triyodotironina radiomarcada (T_3) en la que se utiliza un
anticuerpo de la T_3 como ligante proteico competitivo.
20 Alexander y colaboradores, Clin. Chem., 20:1353 (1974). En
ambos análisis, la columna de Sephadex sirve para combinar
la mezcla de antígeno y molécula marcada mientras que los otros cons-
tituyentes del suero no son retenidos por el gel. A continua-
ción, se incuba una cantidad fija del ligante proteico com-
25 petitivo en el volumen vacío de la columna, durante cuya
incubación los antisueros y la molécula marcada se redistri-
buyen entre la columna y el ligante. La elución con un tam-
pón elimina el complejo de antígeno-ligante mientras que el
antígeno libre permanece unido a la columna de Sephadex.
30 Aunque este sistema es fácilmente automatizado, requiere la

1 carga precisa de cantidades iguales de gel en todas las columnas. Por lo tanto, es necesario agitar continuamente el Sephadex con un agitador magnético mientras se transfiere la suspensión con una pipeta graduada.

5 Boguslaski y colaboradores, Analytical Chemistry, vol. 47, n° 9, 1583 (1975), han descrito recientemente un radioinmunoanálisis en columna para la determinación de digitoxina (peso molecular 765) que emplea una columna de anticuerpo primario inmovilizado que actúa como cámara de reacción y como dispositivo de separación. También se han descrito columnas similares de anticuerpos primarios para radioinmunoanálisis de vitamina B₁₂ (peso molecular 1355), Boguslaski y colaboradores, Clinica Chemica Acta, 62:349 (1975) e insulina (peso molecular aproximadamente 6000), Davis y colaboradores, Clinica Chemica Acta, 66:379 (1976). A la vista del trabajo de Bolton y colaboradores, supra, este método no es universal porque la sensibilidad del análisis para moléculas grandes (v.g. TSH con un peso molecular de 30.000) sería limitada debido a las propiedades de los anticuerpos en fase sólida frente a las grandes moléculas.

15 Se ha descubierto que los combinados inmunoquímicos que contienen imidoésteres positivamente cargados como agentes copulantes constituyen medios excelentes de separación de las fracciones libres de las combinadas en un proceso de inmunoanálisis.

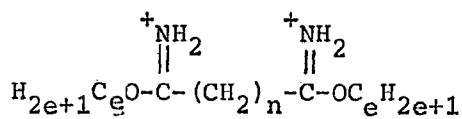
25 Se ha descubierto que los combinados inmunoquímicos que contienen una matriz polisacárida derivatizada, finamente dividida, donde la matriz polisacárida presenta unas dimensiones máximas promedias en mojado de 1 a 18 micras y
30 contiene además imidoésteres positivamente cargados que co-

1 pulan covalentemente dicha matriz polisacárida derivatizada,
finamente dividida, a un anticuerpo, constituyen medios ex-
celentes de separación de las fracciones libres de las com-
binadas sin necesidad de emplear rotación vertical ni ningún
5 otro tipo de agitación continua. Además, los nuevos combina-
dos inmunoquímicos comprendidos dentro de esta invención
presentan un grado de actividad que es muy superior a la acti-
vidad presentada por los combinados inmunoquímicos prepara-
dos por Chan y colaboradores.

10 Se ha descubierto que puede obtenerse un sistema uni-
versal de columna en fase sólida para la separación de frac-
ciones libres y combinadas cuando se utilizan nuevos combi-
nados inmunoquímicos que contienen una matriz polisacárica
derivatizada y también contienen imidoésteres positivamente
15 cargados que copulan covalentemente dicha matriz polisacá-
rida derivatizada a los anticuerpos.

COMPENDIO DE LA INVENCION

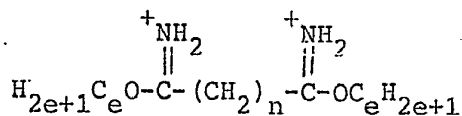
Esta invención se refiere a un método de separación
de las fracciones libres de las combinadas en un proceso de
20 inmunoanálisis del tipo en el que se pone en contacto una
solución con un combinado que comprende una matriz polisa-
cárida derivatizada covalentemente copulada a un anticuerpo
mediante un agente copulante bifuncional, cuyo método se
caracteriza porque dicho agente copulante bifuncional está
25 seleccionado entre el grupo formado por:



donde n es un número entero de 1 a 6 y e es un número ente-
ro de 1 a 2.

30 También se refiere esta invención a un combinado inmu-

1 noquímico para separar las fracciones libres de las combina-
das en un proceso de inmunoanálisis del tipo en el que se
utiliza una matriz polisacárida derivatizada covalentemen-
te copulada a un anticuerpo mediante un agente copulante
5 bifuncional, cuyo combinado se caracteriza porque el agen-
te copulante bifuncional está seleccionado entre el grupo
formado por:



10 donde n es un número entero de 1 a 6 y e es un número ente-
ro de 1 a 2. En una realización de esta invención, el radi-
cal de la matriz polisacárida del combinado inmunoquímico
mejorado presenta una dimensión máxima unitaria promedia de
1 a 18 micras.

15 Esta invención se refiere también a un proceso de inmu-
noanálisis en columna en fase sólida, así como a un aparato
inmunoquímico para uso en el proceso, que utiliza los nue-
vos combinados inmunoquímicos de esta invención.

DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

20 El nuevo combinado inmunoquímico abarcado por esta in-
vención comprende una matriz polisacárida derivatizada cova-
lentemente copulada a un anticuerpo mediante un agente co-
pulante bifuncional. La matriz polisacárida puede ser cual-
quier matriz con una multiplicidad de grupos hidroxilo uni-
dos a la misma, así como sus derivados. Las matrices polisa-
25 cáridas preferidas son los polímeros celulósicos, los políme-
ros de dextrano, la agarosa y sus derivados. Los polímeros
celulósicos y sus derivados son las matrices polisacáridas
de elección.

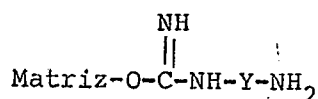
30 En una realización de esta invención, la matriz polisa-

1 cárida debe estar finamente dividida y presentar una dimen-
sión máxima promedia en mojado de 1 a 18 micras, preferible-
mente de 10 a 15 micras. En esta realización, la matriz po-
lisacárida puede ser esférica, lineal o presentar cualquier
5 otra configuración geométrica, siempre que su dimensión má-
xima promedia en mojado (diámetro, lado, longitud) sea la
indicada anteriormente. En el mercado existen varios tipos
de matrices polisacáridas en esta forma finamente dividida,
por ejemplo el gel de dextrano en forma de perlas, marca
10 Sephadex, se encuentra en varias calidades con un diámetro
de la partícula seca de 10 a 40 micras así como menor de 10
micras. También es posible reducir la dimensión máxima prome-
dia en mojado de las matrices polisacáridas mediante técni-
cas químicas, por ejemplo por hidrólisis. Para hidrolizar
15 estas matrices, por ejemplo se pone en contacto la matriz
polisacárida con una solución ácida, v.g. una solución 3 a
10 N de ácido clorhídrico, sulfúrico u otro ácido adecuado,
durante un periodo de tiempo suficiente, v.g. 2 a 24 horas.
Después la mezcla ácida se neutraliza con una solución bá-
20 sica, v.g. una solución 3 a 10 N de hidróxido sódico o potá-
sico, etc y posteriormente se lava y se seca por técnicas
habituales.

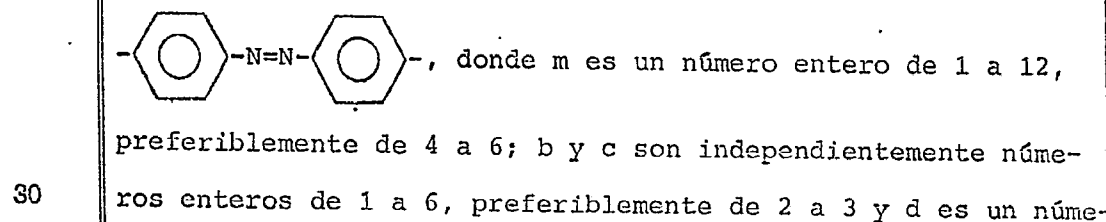
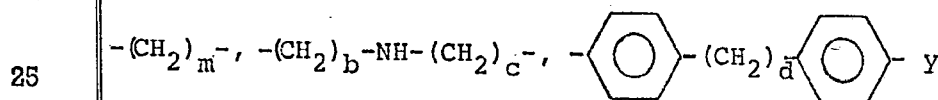
Las matrices polisacáridas pueden ser activadas por
25 cualquier método adecuado conocido por los expertos en este
campo. Son reactivos ilustrativos adecuados para activar la
matriz polisacárida el haluro de cianógeno, la epihalohidrina,
los haluros de haloacetilo y la divinilsulfona. Véase, Patty,
Industrial Hygiene and Toxicology, vol. 2, pág. 634, Inters-
30 cience, New York, N.Y. (1949), Axen y colaboradores, Nature
(London), 214:1302 (1967), Rosner y colaboradores, Biochem.

1 14: 4813 (1975), Jagendorph y colaboradores, Biochimica et
Biophysica Acta, 78:516 (1963) y Porath y colaboradores,
Nature New Biol. 238:261 (1972), incorporándose aquí estas
5 publicaciones en su totalidad a título de referencia. Pre-
feriblemente, para activar la matriz polisacárida se utiliza
como reactivo un haluro de cianógeno o una epihalohidrina.
Todavía mejor, la matriz polisacárida se activa con un reac-
tivo de epihalohidrina o una mezcla de los mismos y, en el
caso más preferido, la matriz polisacárida se activa con epi-
10 clorhidrina.

Después se copula un α, ω -diaminoseparador a la matriz
polisacárida activada anterior a través de los grupos amino
del α, ω -diaminoseparador, formando así una matriz polisacá-
rida derivatizada. Para ilustrar este punto, si la matriz
15 polisacárida ha sido activada con un reactivo haluro de cia-
nógeno, la matriz polisacárida derivatizada responderá a la
fórmula:

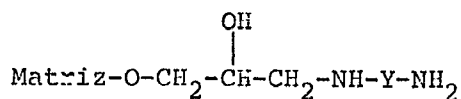


20 donde la matriz es una matriz polisacárida como la definida
anteriormente e Y es un separador. Son separadores ilustrati-
vos los siguientes:



1 ro entero de 1 a 10, preferiblemente de 2 a 4. De preferencia, Y es $-(CH_2)_m-$.

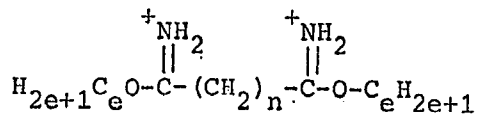
Si la matriz polisacárida ha sido activada con un reactivo de epihalohidrina, otra ilustración es la matriz polisacárida derivatizada de fórmula:



donde matriz e Y son los definidos anteriormente.

El anticuerpo al que se copula covalentemente la matriz polisacárida derivatizada puede ser un anticuerpo primario o un anticuerpo secundario. Como el único requisito de esta invención es que el anticuerpo contenga un resto de lisina, prácticamente todos los anticuerpos primarios y secundarios pueden ser covalentemente copulados a la matriz polisacárida derivatizada debido a que todos los anticuerpos contienen estos restos de lisina. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo secundario.

Lo esencial de esta invención es el uso de imidoésteres como agente copulante para los nuevos combinados inmunológicos. El imidoéster responde a la fórmula general:



donde n es un número entero de 1 a 6, preferiblemente de 4 a 6 y e es un número entero de 1 a 2. El uso de estos imidoésteres permite unir covalentemente los anticuerpos a los soportes sólidos mediante reacciones químicas conocidas que inmovilizan a los anticuerpos primarios y secundarios a través de sus restos de lisina, que en la mayoría de los casos no son esenciales para la actividad inmunológica. Además, la presencia de una matriz positivamente cargada no produ-

1 ce ninguna adsorción no específica adversa sobre este nuevo
combinado inmunológico de la invención.

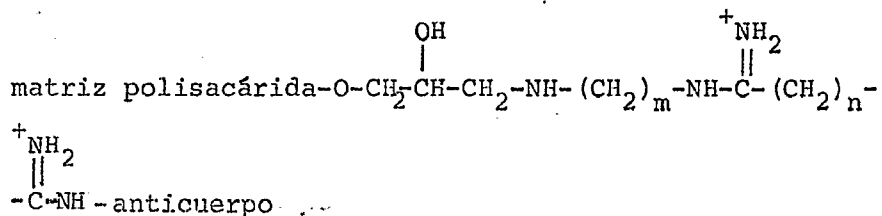
5 Los nuevos combinados inmunológicos de esta invención
pueden ser preparados de acuerdo con el siguiente procedi-
miento general. Se pone en contacto un reactivo activante con
la matriz polisacárida deseada en una solución al pH adecua-
do. El pH puede oscilar en general entre 7,5 y 10,0 aproxima-
damente, estando regido el pH particular por el reactivo acti-
vante y por la matriz polisacárida utilizados. La reacción
10 puede dejarse transcurrir a la temperatura ambiente. Se deja
que el reactivo activante permanezca en contacto con la ma-
triz polisacárida durante un periodo de tiempo suficiente,
desde unos 5 minutos a 5 horas, para que la matriz se active.
El exceso de reactivo activante se separa de la matriz poli-
sacárida activada lavando dicha matriz con un medio adecuado,
15 v.g. agua, solución tamponada (v.g. bicarbonato sódico), etc.
Después la matriz activada se suspende en un medio adecuado,
v.g. una solución acuosa de dimetilformamida. A continuación
se agrega el α, ω -diaminoseparador deseado a la matriz poli-
sacárida activada en suspensión y se deja que la reacción
20 transcurra durante 1 a 10 horas aproximadamente, a la tempe-
ratura ambiente. El exceso de α, ω -diaminoseparador se sepa-
ra de la matriz polisacárida derivatizada lavando dicha ma-
triz con un medio adecuado, v.g. una solución de dimetilfor-
25 mamida, seguido de lavado con un tampón adecuado, v.g. un
tampón de bicarbonato sódico. Después de este doble proceso
de lavado, la matriz polisacárida derivatizada se suspende en
un tampón adecuado, v.g. un tampón de bicarbonato sódico.

30 El agente copulante bifuncional o la mezcla de agentes
se disuelve en una solución básica a unos 4°C. Si es neces-

1 rio, el pH se ajusta a 8-9 aproximadamente. Después la ma-
trix polisacárida derivatizada suspendida se pone en contac-
to con el agente copulante bifuncional disuelto y la mezcla
se hace girar a unos 4°C durante 1 a 5 horas.

5 Después de eliminar el exceso de agente copulante bi-
funcional, la matriz polisacárida derivatizada copulada se
suspende en una mezcla que contiene un tampón adecuado, v.g.
un tampón de bicarbonato sódico y una función anticuerpo pri-
mario o secundario. La mezcla se hace girar durante unas 10
10 a 24 horas en un medio frío. El combinado inmunoquímico se
lava después a fondo con un tampón adecuado, v.g. un tampón
de bicarbonato sódico y a continuación se suspende en un
tampón apropiado a un pH de 8 aproximadamente, v.g. un tam-
pón de barbital que contiene alrededor de 0,1 % de gelatina.

15 El nuevo combinado inmunoquímico de esta invención
tal como se ha preparado por el procedimiento general ante-
rior tiene la siguiente estructura esquemática:
matriz polisacárida derivatizada- $\overset{\text{NH}_2}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_n-\overset{\text{NH}_2}{\text{C}}-\text{NH}$ -anticuerpo
donde los términos matriz polisacárida derivatizada, n y
anticuerpo tienen los significados indicados anteriormente.
El combinado inmunoquímico preferido dentro de esta inven-
ción responde a la fórmula:



donde los términos matriz polisacárida, m, n y anticuerpo
son los definidos anteriormente.

30 El procedimiento de inmunoanálisis de esta invención
consiste en poner en contacto una solución que contiene

1 fracciones libres y combinadas con un nuevo combinado inmu-
noquímico, mediante técnicas conocidas por los expertos en
5 inmunoanálisis y con ello separar las fracciones libres de
las combinadas. Véase Weir, "Immunology for Undergraduates",
Churchill Livingstone, Edinburg, Inglaterra (1973) y
Ratcliffe, British Medical Bulletin 30:32 (1974), incorporan-
do aquí ambas publicaciones en su totalidad a título de re-
ferencia.

10 En una realización preferida, el procedimiento de inmu-
noanálisis implica un método en el que se elimina la agita-
ción continua y con ello la necesidad de tapar los tubos.
Véase Chan y colaboradores, Ann. Clin. Biochem., 12:173 (1975),
incorporándose aquí dicha publicación en su totalidad a tí-
tulo de referencia. En otra realización preferida, el pro-
15 cedimiento de inmunoanálisis se realiza en una columna en
fase sólida, empleando los nuevos combinados inmunoquímicos
de esta invención mediante técnicas conocidas por los exper-
tos en inmunoanálisis y separando con ello las fracciones
libres de las combinadas. Véase, Ratcliffe, supra, Boguslas-
20 ki y colaboradores, Clinica Chemica Acta, 62:349 (1974),
Boguslaski y colaboradores, Analytical Chemistry, vol. 47,
n° 9, 1583 (1975) y Davis y colaboradores, Clinica Chemica
Acta, 66:379 (1976), incorporándose dichas publicaciones
aquí en su totalidad a título de referencia. Preferiblemen-
25 te, los procedimientos de inmunoanálisis de esta invención
son procedimientos RIA cuyas técnicas son también conocidas
por los expertos en este campo. Véase Skelley y colaboradores,
"Radioimmunoassay", Clinical Chemistry, vol. 19, n° 2, 146
30 a 186 (1973), incorporándose aquí dicha publicación por re-
ferencia.

1 Otro método dentro de esta invención es un proceso en sus-
pensión como los descritos anteriormente, a excepción de
que el combinado allí utilizado no es el nuevo combinado
5 inmunológico anteriormente mencionado y descrito con más
detalle en lo que sigue sino un reactivo de inmunoanálisis
constituido por una matriz polisacárida finamente dividida
covalentemente copulada a un anticuerpo secundario mediante
cualquiera de las técnicas conocidas anteriormente por los
10 expertos en este campo. Aunque este último método no presen-
ta el grado de eficacia encontrado en los otros métodos de
esta invención anteriormente descritos, véanse los ejemplos
y la discusión que siguen, no obstante constituye una mar-
cada mejora y presenta claras ventajas sobre los métodos
15 de la técnica anterior con anticuerpos primarios, tales co-
mo el de Chan y colaboradores.

En los métodos en suspensión de la técnica anterior,
el anticuerpo primario se une a una matriz, interfiriendo
con ello adversamente con la reacción biológica anticuerpo
20 primario-antígeno grande. Asimismo, estos métodos de la
técnica anterior requieren una adición precisa del gel (es
decir, combinados que contienen anticuerpos primarios unidos
a las matrices) que crea una fuente constante de errores.
Sin embargo, los métodos en suspensión de acuerdo con esta
25 invención, que utilizan anticuerpos secundarios unidos a las
matrices, eliminan los problemas antes descritos de la téc-
nica anterior.

En general, los nuevos combinados inmunológicos de
esta invención pueden ser empleados en un proceso de inmunoaná-
30 lisis en columna en fase sólida de acuerdo con el siguiente
procedimiento. Los nuevos combinados inmunológicos de esta

1 invención se introducen en cualquier columna o en otra vasi-
ja de reacción adecuada, preferiblemente prelavada con un
tampón adecuado, formando con ello el nuevo aparato inmuno-
químico de esta invención para separar fracciones libres de
5 las combinadas mediante un proceso de inmunoanálisis en co-
lumna de fase sólida. Para reducir al mínimo los costes así
como para aumentar el caudal a través de dicha columna, se
prefiere agregar también a la columna matrices polisacáridas
no activadas de diversos tamaños. Todas las columnas carga-
10 das tienen un volumen de retención inherente (es decir, la
cantidad máxima de fluido que puede ser retenida por la co-
lumna sin que eluya nada de dicho fluido).

Si se desea utilizar los nuevos combinados químicos de
esta invención que contienen anticuerpos secundarios en un
15 procedimiento de inmunoanálisis en columna de fase sólida,
preferiblemente puede realizarse la reacción de inmunoanáli-
sis primario fuera de la columna. Cuando el inmunoanálisis
primario se realiza fuera de la columna, puede efectuarse en
cualquier volumen adecuado, preferiblemente un volumen final
20 de 400 λ . La reacción de inmunoanálisis primario puede durar
de 0,5 a 5 horas, preferiblemente de 0,5 a 1 hora, estando
determinado el tiempo exacto por el análisis realizado. Des-
pués se introduce en la columna una parte alícuota de dicha
mezcla de reacción, con un volumen aproximadamente igual al
25 volumen de retención de la columna rellena y se incuba sobre
la columna de anticuerpo secundario en fase sólida durante
un periodo de 0,5 a 1 hora, estando de nuevo determinado el
tiempo exacto por el análisis que se está siendo realizado.
30 Transcurrido el periodo de incubación, la columna se lava
con una cantidad apropiada de un tampón adecuado, siendo di-

1 cha cantidad suficiente para separar las fracciones libres
de las combinadas (es decir, siendo como mínimo igual al vo-
lumen de retención de la columna). A continuación, la co-
luna, que ahora contiene solamente la fracción combinada,
5 se tapa y se cuenta.

El tiempo de reacción de incubación de las columnas
puede reducirse mucho utilizando un exceso de segundo anti-
cuerpo combinado e incluso se puede eluir inmediatamente a
través de las columnas de segundo anticuerpo en fase sólida
10 si se utiliza un exceso de segundo anticuerpo.

El procedimiento de inmunoanálisis descrito anterior-
mente que utiliza las columnas de segundo anticuerpo en fa-
se sólida de esta invención, por lo tanto, puede ser separa-
do en tres etapas básicas: incubación de la reacción de anti-
15 cuerpo primario en una estación separada de la columna, apli-
cación de una parte alícuota de la mezcla de reacción a la
columna de segundo anticuerpo en fase sólida y elución de la
fracción libre con un tampón inmediatamente o después de un
periodo mínimo de incubación sobre la columna.

20 El procedimiento descrito de segundo anticuerpo en fa-
se sólida es sencillo, fácilmente automatizable, preciso y
versátil. Así, utilizando los nuevos combinados inmunoquími-
cos de esta invención, pueden realizarse análisis de grandes
moléculas (v.g. TSH) y pequeños haptenos (digoxina, T_4 , T_3).
25 Además, se obtienen fracciones libres y combinadas separadas
por completo, con un amplio margen de error en las condicio-
nes utilizadas para la separación. El método no interfiere
con la reacción de combinación primaria, es relativamente
económico, y hace uso de equipos y reactivos fácilmente ase-
30 quibles.

1

En relación con las moléculas pequeñas, las columnas de segundo anticuerpo en fase sólida comprendidas dentro de esta invención pueden ser empleadas en más de una forma. Las columnas pueden ser cargadas con anticuerpo primario, antígeno (o hapteno) marcado y muestra y dejar que transcurran simultáneamente, en el volumen hueco de la columna, la reacción primaria y la reacción con el anticuerpo en fase sólida. Después de un periodo dado de tiempo, las columnas se eluyen con tampón para separar las fracciones libres de las combinadas.

5

10

15

Otro método consiste en incubar el anticuerpo primario sobre la columna de segundo anticuerpo en fase sólida y producir así columnas de anticuerpo primario sobre las que el anticuerpo primario está biológicamente combinado al segundo anticuerpo covalentemente ligado. Después se incuban la molécula marcada y la muestra sobre las columnas que sirven como dispositivo para separar las fracciones libres de las combinadas.

20

Además del método descrito en la columna en fase sólida, también esta invención considera el empleo de los nuevos combinados inmunoquímicos que contienen anticuerpos primarios covalentemente copulados a una matriz polisacárida derivatizada.

25

30

Además, otro método comprendido dentro de esta invención consiste en un inmunoanálisis en columna de fase sólida donde el combinado utilizado no es el nuevo combinado inmunoquímico antes descrito sino un reactivo de inmunoanálisis constituido por una matriz polisacárida covalentemente copulada a un anticuerpo secundario mediante cualquiera de las diversas técnicas conocidas por los expertos en este cam-

1 po. Aunque este último método no presenta el grado de efica-
cia encontrado en los otros métodos de esta invención, cons-
tituye no obstante una marcada mejora y presenta claras ven-
5 tajas sobre los procesos en columna primaria en fase sólida
de la técnica anterior. Aunque se produce una pérdida de
actividad del anticuerpo (título) cuando se copula covalente-
mente un segundo anticuerpo a una matriz polisacárida derivada,
10 vatizada, no obstante el consumo del segundo anticuerpo es
reducido debido a que no se requieren grandes cantidades de
globulina portadora como en el caso del procedimiento del
doble anticuerpo en estado líquido. Otra ventaja de un pro-
cedimiento de inmunoanálisis empleando las columnas de se-
gundo anticuerpo en fase sólida es que este método alivia el
15 problema de dispensar con precisión una cantidad exacta de
segundo anticuerpo a partir de una suspensión de gel, porque
en este método solo se necesita una cantidad mínima de se-
gundo anticuerpo. Los niveles por encima de esta cantidad
mínima preestablecida no ejercen ningún efecto sobre la sen-
sibilidad ni sobre la precisión de los resultados obtenidos
20 mediante el nuevo método de esta invención.

Los siguientes ejemplos se dan solamente con fines
ilustrativos y no deben considerarse como limitativos de la
invención descrita.

EJEMPLO 1

25 Se añaden 3 ml de epiclorhidrina a una mezcla de 6 g
de celulosa microcristalina Tipo 50 (tamaño medio de partí-
cula 50 micras) en 30 ml de hidróxido sódico 1N, con intensa
agitación a la temperatura ambiente. Al cabo de 2 horas, se
elimina el exceso de epiclorhidrina lavando con 1 litro de
30 agua. La matriz celulósica activada y lavada se suspende des

1

pués en 60 ml de una solución acuosa al 50 % de dimetilformamida. A esta matriz activada en suspensión se añaden 0,85 g de 1,6-hexanodiamina. Se deja que transcurra la reacción con agitación durante 2 horas a la temperatura ambiente y después se elimina el exceso de 1,6-hexanodiamina lavando con 1 litro de una solución acuosa al 50 % de dimetilformamida. Después de lavar con 1 litro de bicarbonato sódico 0,1M, la matriz celulósica derivatizada se suspende en bicarbonato sódico 0,1M para dar una mezcla 1:1 de matriz derivatizada y bicarbonato sódico.

5

10

15

Se disuelven 0,735 g (3 milimoles) de adipato de dimetilo (ADM) en 0,6 ml de solución fría de hidróxido sódico 5N, agitando a 4°C. Después de añadir bicarbonato sódico 0,1M frío, el pH se ajusta a 8,5 con hidróxido sódico 1N. A esta solución se agregan 6 ml de bicarbonato sódico 0,1M conteniendo de 0,8 a 1,0 g de celulosa derivatizada y la mezcla se hace girar a 4°C durante 2 horas.

20

25

Después de eliminar el exceso de adipimidato de dimetilo, la matriz celulósica derivatizada copulada se suspende en 9 ml de bicarbonato sódico 0,1M (4°C), se añaden 1,1 ml de una fracción de γ -globulina anti-conejo de cabra (42,82 mg/ml) en bicarbonato sódico 0,1M (4°C) y la mezcla se hace girar en un recinto frío. El segundo anticuerpo inmovilizado se lava después bien con carbonato sódico 0,1M y finalmente se suspende en 10 ml de tampón de barbitol, pH 8,0, que contiene 0,1 % de gelatina.

30

También se prepara otro combinado inmunoquímico de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1, a excepción de que el agente copulante bifuncional utilizado es dihidroclo-

1 ruro de suberimidato de dimetilo (SDM) en lugar del ADM del
Ejemplo 1.

EJEMPLO 2

5 Se añade 1 g de celulosa microcristalina Tipo 50 a una
solución de 1,0 g de bromuro de cianógeno en agua, a la tem-
peratura ambiente. El pH de la mezcla se ajusta inmediatamen-
te a 11,0 aproximadamente con hidróxido sódico 2N y se man-
tiene a este pH durante 6 a 12 minutos mediante la adición
10 controlada de hidróxido sódico 2N. Después de haberse esta-
bilizado el pH a 11 aproximadamente, la mezcla se deja en
reposo durante 5 a 10 minutos más, antes de lavar la matriz
celulósica activada con 1,1 litros de bicarbonato sódico
0,1N a 4°C para separar el exceso de bromuro de cianógeno.

15 La matriz celulósica activada, lavada a fondo, se sus-
pende después en 10 ml de bicarbonato sódico 0,1N y se aña-
den a la misma alrededor de 47 mg de γ -globulina anti-conejo
de cabra en 1,3 ml de bicarbonato sódico 0,1N. Después la
suspensión se mezcla a la temperatura ambiente durante la
noche.

20 Al día siguiente, el combinado inmunoquímico se lava
con 600 ml de bicarbonato sódico 0,1N y 100 ml de tampón de
barbital (pH 8,0) que contiene 0,1 % de gelatina. Finalmente
el combinado se suspende en unos 10 ml del tampón de barbital
anterior conteniendo gelatina.

EJEMPLO 3

25 Unos preparados en fase sólida de celulosa microcrista-
lina activada, obtenidos en los Ejemplos 1 y 2, se valoran
frente a γ -globulina de conejo marcada con ^{125}I como sigue:

30 200 λ - tampón de barbital a pH 8,0, conteniendo 3,5 % de

ABS

1 100 λ - γ-globulina de conejo marcada con ¹²⁵I conteniendo 0,1 % de suero de conejo normal

100 λ - tampón de barbital a pH 8,0

200 λ - preparado de segundo anticuerpo en fase sólida

5 Todos los tubos se incuban a la temperatura ambiente durante media hora con sacudidas y posteriormente se centrifugan durante 20 minutos a 1000 x g.

10 Las unidades de actividad se calculan a partir de la dilución máxima, es decir, título, del segundo anticuerpo en fase sólida que da lugar a la máxima combinación de antígeno marcado. La fórmula utilizada para calcular las unidades de actividad es la siguiente:

$$15 \frac{1}{\text{título}} \times \frac{\text{volumen total de prepa}}{\text{tamaño de la muestra}} \times \frac{\text{Unidades de}}{\text{raro de anticuerpo en}} \text{ fase sólida} = \text{actividad}$$

15 donde el tamaño de la muestra en nuestro ejemplo es 200 λ (0,2 ml) y donde el volumen total del preparado de segundo anticuerpo en fase sólida es 10 ml. Como estos títulos se realizaron en presencia de 100λ de suero de conejo normal al 0,1 %, en realidad se buscan las grandes diluciones de segundo anticuerpo en fase sólida capaces de combinar alrededor de 1 microgramo de γ-globulina de conejo. Los resultados de estos cálculos se encuentran en la Tabla I. Como indica claramente esta Tabla I, el título del antisuero anti-conejo de cabra copulado a la celulosa derivatizada con ADM es muy superior al correspondiente preparado de celulosa microcristalina copulado con bromuro de cianógeno (CNBr).

EJEMPLO 4

30 La celulosa derivatizada preparada en el Ejemplo 2, y la versión SDM del Ejemplo 1 se valoran frente a ¹²⁵I-tiroxi-

1 na en presencia de alrededor de 1 microgramo de γ -globulina de conejo como sigue:

20 λ - tampón de barbital a pH 8,0 conteniendo 3,5 % de ABS

5 100 λ - 125 I-tiroxina en tampón de barbital a pH 8,0 conteniendo 2 % de ABS

100 λ - antisuero de conejo frente a tiroxina, a una dilución de 1 por 1000 en tampón de barbital a pH 8,0

200 λ - preparado de segundo anticuerpo en fase sólida.

10 Todos los tubos se incubaron a la temperatura ambiente durante una media hora con sacudidas y posteriormente se centrifugaron durante 20 minutos a 1000 x g. Después los precipitados se suspendieron en 1,0 ml de tampón de barbital a pH 8,0 conteniendo 2 % de ABS y se centrifugaron durante 20 minutos a 1000 x g. En estos experimentos, la tiroxina marcada es inmunológicamente combinada a sus anticuerpos específicos que están presentes como fracción de aproximadamente un microgramo de γ -globulina de conejo. Así, en este ejemplo, es posible medir indirectamente las unidades de segundos anticuerpos combinados a la matriz celulósica, calculando la máxima dilución de preparado de segundo anticuerpo en fase sólida que da la máxima combinación de tiroxina marcada.

20 La Tabla I contiene los resultados de estos análisis. Como pone de manifiesto claramente la Tabla I, los experimentos con SDM se comparan favorablemente con los datos obtenidos con ADM y ambos preparados superan con mucho a sus correspondientes controles con bromuro de cianógeno. También se obtienen mejoras similares en la cantidad de unidades de actividad recuperadas cuando los nuevos combinados inmunológicos de esta invención contienen anticuerpos primarios en

1 lugar de anticuerpos secundarios.

5 Por lo tanto, los nuevos combinados inmunoquímicos positivamente cargados de esta invención, conteniendo imido-ésteres bifuncionales como agentes copulantes, deben considerarse como una marcada mejora sobre los combinados inmunoquímicos de la técnica anterior utilizados en los procedimientos de inmunoanálisis.

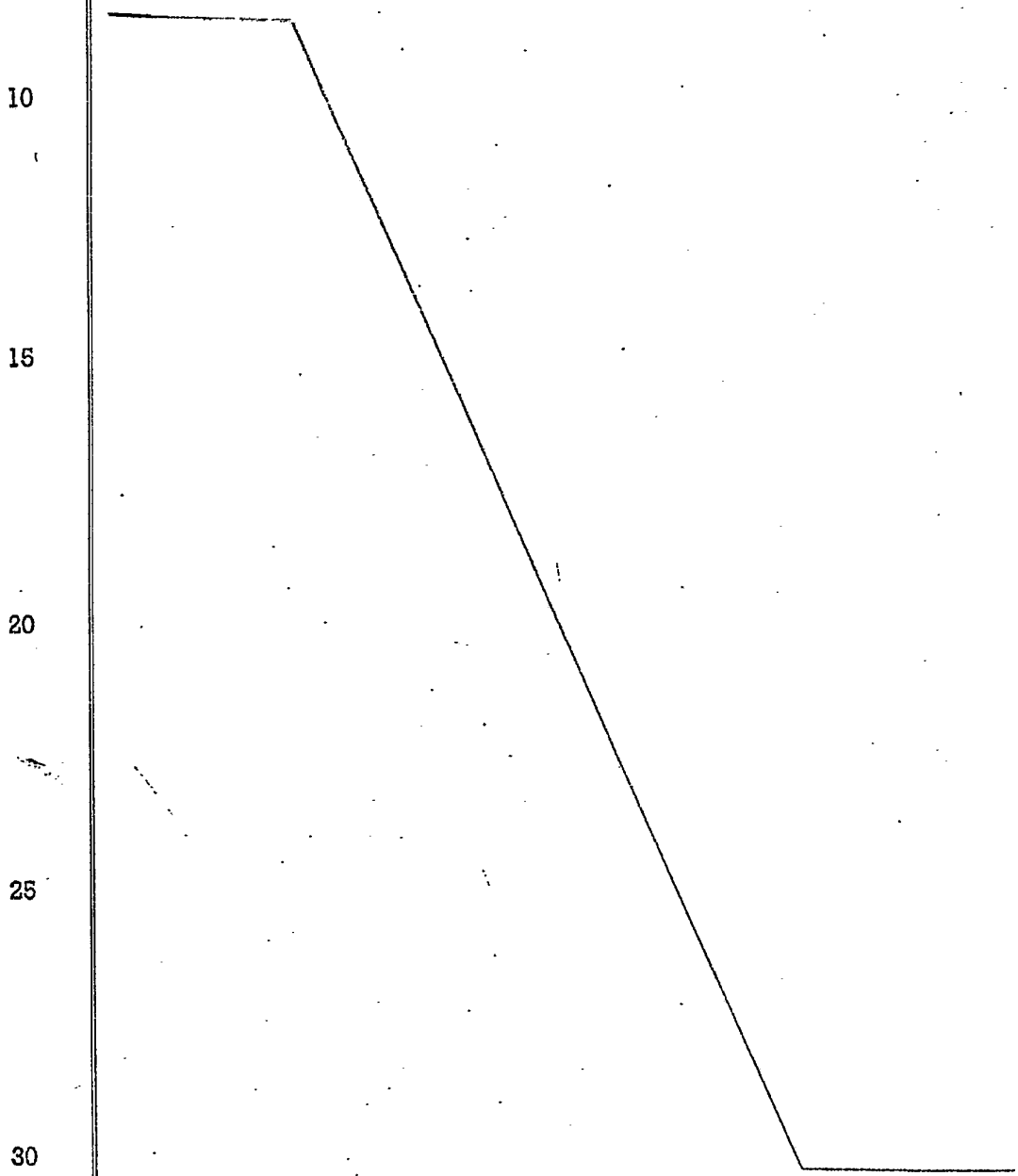


TABLA I.

	SopORTE	Concentración de proteínas de la fracción de γ -globulina que contiene anticuerpo	Título	Unidades de actividad recuperada	Porcentaje de aumento de la actividad recuperada
1	*A. 1 g de celulosa microcristalina activada con bromuro de cianógeno	47 mg de γ -globulina anti-conejo de cabra	1/2.3	115	-
5	A. 1 g de celulosa microcristalina activada con adipimidato de dimetilo	47 mg de γ -globulina anti-conejo de cabra	1/16,5	850	739
	**B. 1 g de celulosa microcristalina activada con bromuro de cianógeno	40 mg de γ -globulina anti-conejo de cabra	1/3,2	160	-
10	B. 1 g de celulosa microcristalina activada con suberimidato de dimetilo	40 mg de γ -globulina anti-conejo de cabra	1/16	800	500

*A - gamma-globulina de conejo marcada con ^{125}I

**B - tiroxina marcada con ^{125}I .

15

20

25

50

1

TABLA I.

Concentración de proteínas de la fracción de γ -globulina que contiene anticuerpo

5

*A.	1 g de celulosa microcristalina activada con bromuro de cianógeno	47 mg de γ -globulina anti-conejo de cabra
-----	---	---

A.	1 g de celulosa microcristalina activada con adipimidato de dimetilo	47 mg de γ -globulina anti-conejo de cabra
----	--	---

**B.	1 g de celulosa microcristalina activada con bromuro de cianógeno	40 mg de γ -globulina anti-conejo de cabra
------	---	---

10

B.	1 g de celulosa microcristalina activada con suberimidato de dimetilo	40 mg de γ -globulina anti-conejo de cabra
----	---	---

*A - gamma-globulina de conejo marcada con ^{125}I

**B - tiroxina marcada con ^{125}I .

15

20

25

30

TABLA I.

Concentración de proteínas de la fracción de γ -globu- lina que contiene anticuerpo	Título	Unidades de acti- vidad recuperada	Porcentaje de aumento de la actividad recuperada
7 mg de γ -globulina anti- onejo de cabra	1/2,3	115	-
7 mg de γ -globulina anti- onejo de cabra	1/16,5	850	739
0 mg de γ -globulina anti- onejo de cabra	1/3,2	160	-
0 mg de γ -globulina anti- onejo de cabra	1/16	800	500

1

EJEMPLO 5

5

10

Se añaden 9 g de celulosa microcristalina Tipo 50 (tamaño medio de partícula 50 micras) a 30 ml de una solución de ácido clorhídrico 6N y la mezcla se agita durante 4 horas a la temperatura ambiente. Transcurridas las 4 horas de reacción, la mezcla se neutraliza con una solución 6N de hidróxido sódico y la celulosa hidrolizada se lava con 1200 ml de agua. La celulosa empaquetada se lava de nuevo con 300 ml de metanol seguidos de 100 ml de éter dietílico. El residuo gelificado se suspende en 100 ml de éter y se seca a presión reducida.

15

20

Se repite varias veces el Ejemplo 5, siendo la única modificación el tiempo de reacción. Este último se varía desde 4 horas a periodos de 6, 24 y 64 horas. El examen microscópico descubre que la celulosa microcristalina Tipo 50 que ha sido hidrolizada durante 4 y 6 horas presenta una longitud media en mojado de 15 a 20 micras aproximadamente y la que ha sido hidrolizada durante 24 y 64 horas presenta una longitud media en mojado de 10 a 12 micras aproximadamente.

25

30

EJEMPLO 6

Se añaden 3 ml de epiclorhidrina a una mezcla de 6 g de celulosa microcristalina Tipo 50 en 30 ml de hidróxido sódico 1N, con intensa agitación a la temperatura ambiente. Al cabo de 2 horas, se elimina el exceso de epiclorhidrina lavando con 1 litro de agua. La matriz celulósica activada y lavada se suspende después en 60 ml de una solución acuosa al 50 % de dimetilformamida. A esta matriz activada en suspensión se añaden 0,85 g de 1,6-hexanodiamina. Se deja que la reacción transcurra con agitación durante 2 horas a la temperatura ambiente y después el exceso de 1,6-hexanodiamina se

1 elimina por lavado con 1 litro de una solución acuosa al 50 %
de dimetilformamida. Después de lavar con 1 litro de bicarbo-
nato sódico 0,1M, la matriz celulósica derivatizada se sus-
5 pende en bicarbonato sódico 0,1M para dar una mezcla 1:1 de
matriz derivatizada y bicarbonato sódico.

Se disuelven 0,80 g (3 milimoles) de suberimidato de
dimetilo (SDM) en 0,6 ml de solución fría de hidróxido sódico
5N, agitando a 4°C. Después de añadir bicarbonato sódico
0,1M frío, el pH se ajusta a 8,5 con hidróxido sódico 1N. A
10 esta solución se añaden 6 ml de bicarbonato sódico 0,1M con-
teniendo de 0,8 a 1,0 g de celulosa derivatizada y la mezcla
se hace girar a 4°C durante 2 horas.

Después de eliminar el exceso de SDM, la matriz celu-
lósica derivatizada copulada se suspende en 9 ml de bicarbona-
15 to sódico 0,1M (4°C) y 1,3 ml de una fracción de γ -globulina
anti-conejo de cabra (36 a 38 mg/ml) en bicarbonato sódico
0,1M (4°C) y la mezcla se hace girar en un recinto frío. El
anticuerpo secundario inmovilizado se lava después a fondo
20 con bicarbonato sódico 0,1M y finalmente se suspende en tampón
de barbital, pH 8,7, que contiene 0,1 % de gelatina, para dar
un volumen final de 25 ml.

Se repite el Ejemplo 6, modificando solamente el tamaño
de la celulosa microcristalina utilizada. Los otros tamaños
de celulosa microcristalina empleados son celulosa microcrista-
25 lina Tipo 20 y celulosa microcristalina Tipo 50 que han si-
do hidrolizados durante, 4, 6, 24 y 64 horas.

EJEMPLO 7

Se agregó 1 g de celulosa microcristalina Tipo 50 a una
solución de 1,0 g de bromuro de cianógeno (CNBr) en agua, a
30 la temperatura ambiente. Inmediatamente se ajusta el pH de

1 la mezcla a 11,0 aproximadamente con hidróxido sódico 2N y
se mantiene a este pH durante 6 a 12 minutos mediante la adi-
ción controlada de hidróxido sódico 2N. Después de que el pH
se ha estabilizado a 11 aproximadamente, la mezcla se deja
5 en reposo durante 5 a 10 minutos más antes de lavar la ma-
triz celulósica activada con 1,1 litros de bicarbonato sódico
0,1N a 4°C para eliminar el exceso de CNBr.

La matriz celulósica activada, bien lavada, se suspen-
de después en 10 ml de bicarbonato sódico 0,1N y se añaden
10 unos 47 mg de γ -globulina anti-conejo de cabra en 1,3 ml
de bicarbonato sódico 0,1N. Después la suspensión se mezcla a
la temperatura ambiente durante la noche.

Al día siguiente, el combinado inmunológico se lava
con 600 ml de bicarbonato sódico 0,1N y 100 ml de tampón de
15 barbital (pH 8,0) conteniendo 0,1 % de gelatina. Finalmente,
el combinado se suspende en el tampón de barbital conteniendo
gelatina anterior para dar una solución final de 25 ml.

Se repite el Ejemplo 7 modificando solamente el tamaño
de la celulosa microcristalina utilizada. Los otros diversos
20 tamaños de celulosa microcristalina empleada son celulosa mi-
crocristalina Tipo 20 y celulosa microcristalina Tipo 50 que
han sido hidrolizadas durante 4, 6, 24 y 64 horas.

EJEMPLO 8

25 Unos preparados sólidos de segundo anticuerpo de celulo-
sa microcristalina Tipo 50, obtenidos en los Ejemplos 6 y 7,
se valoran frente a ^{125}I -tiroxina en presencia de alrededor
de 1 microgramo de gamma-globulina de conejo, como sigue:

20 λ - tampón de barbital a pH 8,0 conteniendo 3,5 % de

ABS

30

100 λ - ^{125}I -tiroxina en tampón de barbital pH 8,0 contienien

1

do 2 % de ABS

100 λ - antisuero de conejo frente a tiroxina a una dilución de 1/1000 (conteniendo alrededor de 1 microgramo de IgG de conejo)

5

200 λ - preparados de segundo anticuerpo en fase sólida.

10

En los experimentos donde los reactivos son agitados, cada tubo se incuba a la temperatura ambiente durante media hora con sacudidas y posteriormente se centrifuga durante 20 minutos a 100 x g. Los precipitados se suspenden en 1,0 ml de tampón de barbital, pH 8,0, conteniendo 3,5 % de ABS y se centrifugan de nuevo durante 20 minutos a 1000 x g. Sin embargo, en los experimentos donde los reactivos no se agitan, cada tubo se incuba a 37°C durante media hora y antes de la centrifugación, se añade 1 ml de tampón de barbital a pH 8 conteniendo 3,5 % de ABS. Posteriormente cada tubo se centrifuga a 1000 x g durante 20 minutos.

15

20

En estos dos tipos de experimentos, la tiroxina marcada está inmunológicamente combinada a sus anticuerpos específicos que se encuentran presentes como fracción de aproximadamente 1 microgramo de gamma-globulina de conejo. Así, es posible medir indirectamente las unidades de segundo anticuerpo combinadas a las diferentes matrices celulósicas calculando la dilución máxima de cada uno de los preparados de anticuerpos precipitantes en fase sólida para dar la máxima combinación de tiroxina marcada.

25

30

Las unidades de actividad se calcularon como se ha descrito anteriormente, a excepción de que el volumen total de preparado de anticuerpo secundario en fase sólida es 25 ml. Los resultados de estos cálculos se encuentran en las Tablas II y III. Como se observa claramente en las Tablas II y III,

1 el título del antisuero anti-conejo de cabra copulado a la
celulosa derivatizada con SDM, finamente dividida, es muy su-
perior al del correspondiente preparado copulado con CNBr
de celulosa microcristalina finamente dividida. De hecho, el
5 título de dicha celulosa derivatizada con SDM, finamente divi-
dida, que no ha sido sometida a sacudidas, es incluso supe-
rior al de los preparados copulados con CNBr sacudidos.

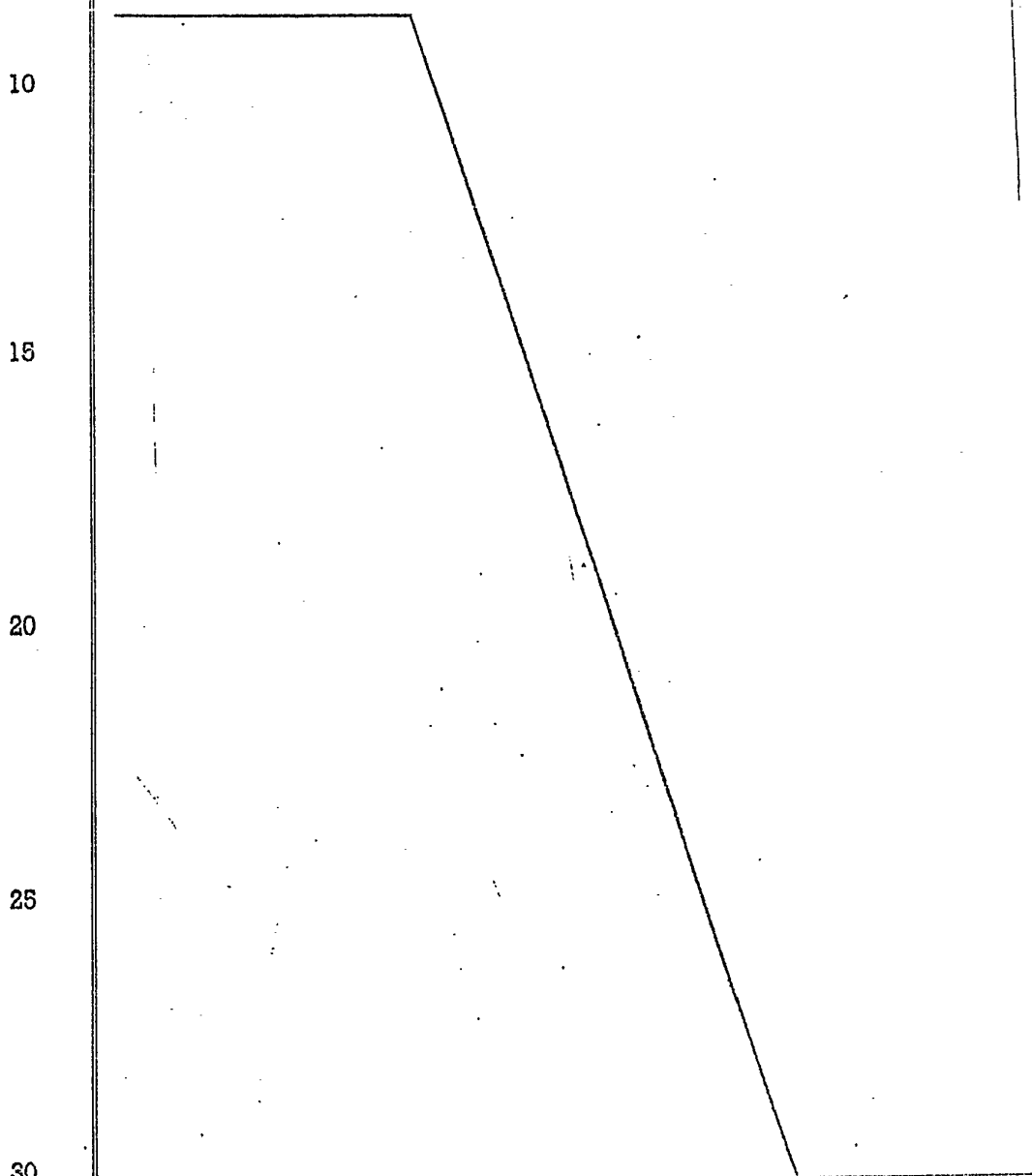


TABLA II

Soporte	Concentración de proteínas de la fracción de gamma-globulina que contiene el anticuerpo	Título con sacudidas	Unidades de actividad recuperadas con sacudidas	Unidades de Unidades con actividad re sacudidas	
				Título sin sacudidas	Unidades sin sacudidas
1 g de celulosa microcristalina Tipo 50 activada con CNBr	47 mg de gamma-globulina anti-conejo de cabra	1/1,6	212	0	0
1 g de celulosa microcristalina Tipo 20 activada con CNBr	"	1/3,7	462	1/1,6	43,29 %
1 g de celulosa microcristalina Tipo 50 hidrolizada con ácido durante 4 horas y activada con CNBr	"	1/5	625	1/2,9	57,92 %
1 g de celulosa microcristalina Tipo 50 hidrolizada con ácido durante 6 horas y activada con CNBr	"	1/5	625	1/2,9	57,92 %
1 g de celulosa microcristalina Tipo 50 hidrolizada con ácido durante 24 horas y activada con CNBr	"	1/5	625	1/3,4	68,00 %
1 g de celulosa microcristalina Tipo 50 hidrolizada con ácido durante 64 horas y activada con CNBr	"	1/5,5	688	1/3,4	61,77 %

1

5

10

15

20

25

30

1
5
10
15
20
25
30

TABLA II

Soporte	Concentración de proteínas de la fracción de gamma-globulina que contiene el anticuerpo	Título con sacudidas
1 g de celulosa microcristalina Tipo 50 activada con CNBr	47 mg de gamma-globulina anti-conejo de cabra	1/1,6
1 g de celulosa microcristalina Tipo 20 activada con CNBr	"	1/3,7
1 g de celulosa microcristalina Tipo 50 hidrolizada con ácido durante 4 horas y activada con CNBr	"	1/5
1 g de celulosa microcristalina Tipo 50 hidrolizada con ácido durante 6 horas y activada con CNBr	"	1/5
1 g de celulosa microcristalina Tipo 50 hidrolizada con ácido durante 24 horas y activada con CNBr	"	1/5
1 g de celulosa microcristalina Tipo 50 hidrolizada con ácido durante 64 horas y activada con CNBr	"	1/5,5

TABLA II

proteínas de gamma-globulina anticuerpo	Título con sacudidas	Unidades de acti- vidad recuperadas con sacudidas	Título sin sacudidas	Unidades de Unidades con actividad re sacudidas. ³	
				cuperadas sin sacudidas	Unidades sin sacudidas
a-globulina anti- ra	1/1,6	212	0	0	0
"	1/3,7	462	1/1,6	200	43,29 %
"	1/5	625	1/2,9	362	57,92 %
"	1/5	625	1/2,9	362	57,92 %
"	1/5	625	1/3,4	425	68,00 %
"	1/5,5	688	1/3,4	425	61,77 %

TABLA III

Soporte	Concentración de proteínas de la fracción de gamma-globulina que contiene el anticuerpo	Título con sacudidas	Unidades de actividad recuperadas con sacudidas	Título sin sacudidas	Unidades de actividad recuperada sin sacudidas	Unidades con sacudidas Unidades sin sacudidas
1 g de celulosa microcristalina Tipo 50 activada con SDM	49 mg de gamma-globulina anti-f. conejo de cabra	1/5	750	1/2	250	33,33 %
1 g de celulosa microcristalina Tipo 20 activada con SDM	"	1/11,5	1438	1/5,1	638	44,37 %
1 g de celulosa microcristalina Tipo 50 hidrolizada con ácido durante 4 horas y activada con SDM	"	1/11,5	1438	1/7,0	875	60,85 %
1 g de celulosa microcristalina Tipo 50 hidrolizada con ácido durante 6 horas y activada con SDM	"	1/11,5	1438	1/7,0	875	60,85 %
1 g de celulosa microcristalina Tipo 50 hidrolizada con ácido durante 24 horas y activada con SDM	"	1/11,5	1438	1/7,0	875	60,85 %
1 g de celulosa microcristalina Tipo 50 hidrolizada con ácido durante 64 horas y activada con SDM	"	1/11,5	1438	1/7,0	875	60,85 %

1

5

10

15

20

25

50

TABLA III

1	Soporte	Concentración de proteínas de la fracción de gamma-globulina que contiene el anticuerpo	Título con sacudidas	U a c s
5	1 g de celulosa microcristalina Tipo 50 activada con SDM	49 mg de gamma-globulina anti-conejo de cabra	1/5	
	1 g de celulosa microcristalina Tipo 20 activada con SDM	" "	1/11,5	
	1 g de celulosa microcristalina Tipo 50 hidrolizada con ácido durante 4 horas y activada con SDM	" "	1/11,5	
10	1 g de celulosa microcristalina Tipo 50 hidrolizada con ácido durante 6 horas y activada con SDM	" "	1/11,5	
	1 g de celulosa microcristalina Tipo 50 hidrolizada con ácido durante 24 horas y activada con SDM	" "	1/11,5	
15	1 g de celulosa microcristalina Tipo 50 hidrolizada con ácido durante 64 horas y activada con SDM	" "	1/11,5	
20				
25				
30				

TABLA III

Reacción de proteínas de de gamma-globulina de el anticuerpo	Título con sacudidas	Unidades de actividad re- cuperadas con sacudidas	Título sin sacudidas	Unidades de actividad re- cuperada sin sacudidas	Unidades con sacudidas <hr/> Unidades sin sacudidas %
gamma-globulina anti- de cabra	1/5	750	1/2	250	33,33 %
"	1/11,5	1438	1/5,1	638	44,37 %
"	1/11,5	1438	1/7,0	875	60,85 %
"	1/11,5	1438	1/7,0	875	60,85 %
"	1/11,5	1438	1/7,0	875	60,85 %
"	1/11,5	1438	1/7,0	875	60,85 %

TABLA IV

Soporte	Con sacudidas		Sin sacudidas		Unidades de actividad por SDM sin sacudidas	Unidades de actividad por CIBr con sacudidas
	Unidades de actividad por SDM	Unidades de actividad por CNBR	Unidades de actividad por SDM	Unidades de actividad por CNBR		
Celulosa microcristalina Tipo 50	750/212 = 3,54	250/0 = indefinido	250/212 = 1,18			
Celulosa microcristalina Tipo 20	1438/462 = 3,11	638/200 = 3,19	638/462 = 1,38			
Celulosa microcristalina Tipo 50 hidrolizada con ácido durante 4 horas	1438/625 = 2,30	875/362 = 2,42	875/625 = 1,40			
Celulosa microcristalina Tipo 50 hidrolizada con ácido durante 24 horas	1438/625 = 2,30	875/425 = 2,06	875/625 = 1,40			
Celulosa microcristalina Tipo 50 hidrolizada con ácido durante 64 horas	1438/625 = 2,09	875/425 = 2,06	875/625 = 1,27			

TABLA V

Tiempo de análisis a 37°C	Sueros de control			
	Suero de con tiroxina Beckman	Suero de con tiroxina Beckman 1/2	Suero de con tiroxina Beckman diluido	Suero de con TSH Ortho
1/2 h	2,75 (2,0-2,7)*	-	-	1,44 (>6,0) (0,6-1,2) (3,2-5,2)
2 h	86 (90-110)	222 (165-225)	85 (70-90)	116 (409-457)
1/2 h	-	-	5,0 (6-7)	7,2 (13,6-22)
6 h	-	-	77,0 (40-75)	3,7 (3-4) 2,3-2,55 (3,9-7,9) (23-39)

* Los valores entre paréntesis son los obtenidos con el método convencional de éxle anticuerpo.

TABLA IV

1

5

10

Soporte	Con sacudidas	Sin sacudidas
	Unidades de actividad por SDM	Unidades de actividad por SDM
	Unidades de actividad por CNBr	Unidades de actividad por CNBr
Celulosa microcristalina Tipo 50	750/212 = 3,54	250/0 = indefinido
Celulosa microcristalina Tipo 20	1438/462 = 3,11	638/200 = 3,19
Celulosa microcristalina Tipo 50 hidrolizada con ácido durante 4 horas	1438/625 = 2,30	875/362 = 2,42
Celulosa microcristalina Tipo 50 hidrolizada con ácido durante 24 horas	1438/625 = 2,30	875/425 = 2,06
Celulosa microcristalina Tipo 50 hidrolizada con ácido durante 64 horas	1438/625 = 2,09	875/425 = 2,06

TABLA V

15

20

25

	Tiempo de análisis a 37°C	Sueros de control			
		Suero de control digoxina Beckman	Suero de control tiroxina Beckman	Suero de control triyodo tironina Beckman	Suero de control TSH Beckman
Digoxina (ng/ml)	1/2 h	2,75(2,0-2,7)*	-	-	-
Triyodotironina (ng/dl)	2 h	-	86 (90-110)	222 (165-225)	85 (70-90)
Tiroxina (µg/dl)	1/2 h	-	12,3 (12-20)	-	5,0 (6-7)
Hormona estimulante de la tirotropina humana (micro-unidades internacionales/ml)	6 h	-	-	-	77,0 (40-75)

* Los valores entre paréntesis son los obtenidos con el método convencional de doble ant

30

3IA IV

Sin sacudidas		Unidades de actividad por SDM sin sacudidas
Unidades de actividad por SDM	Unidades de actividad por CNBr	Unidades de actividad por CNBr con sacudidas
250/0 = indefinido		250/212 = 1,18
638/200 = 3,19		638/462 = 1,38
875/362 = 2,42		875/625 = 1,40
875/425 = 2,06		875/625 = 1,40
875/425 = 2,06		875/625 = 1,27

3IA V

Sueros de control

Suero de control	Suero de control TSH Beckman	Suero de control TSH Beckman, diluido 1/2	Lederle I	Lederle II	Ortho I	Ortho II
-	-	-	1,44 (0,94-1,73)	>6,0 474 (409-457)	0,62 (0,6-1,2)	4,25 (3,2-5,2)
222 (15-225)	85 (70-90)	-	116 (98-118)	474 (409-457)	-	-
-	5,0 (6-7)	-	7,2 (6,4-9,6)	16,1 (13,6-22)	-	-
-	77,0 (40-75)	35,2	3,7 (3-4)	2,6 2,3-2,95	7,2 (3,9-7,9)	32,2 (23-39)

o convencional de cable anticuerpo.

1 Se repitió el Ejemplo 8 pero variando el tamaño de la
celulosa microcristalina. Esta variación, como antes implicó
el uso de celulosa microcristalina Tipo 20 y celulosa micro-
cristalina Tipo 50 que han sido hidrolizadas durante 4, 6,
5 24 y 64 horas. Los resultados de éstos ensayos se encuentran
también en las Tablas II y III.

10 El examen de la Tabla II revela varios hechos. En la co-
lumna titulada "Unidades de actividad recuperada con sacudi-
das", como el vial está siendo sacudido, todos los tamaños de
matriz deben estar igualmente mezclados e igualmente suspen-
didos y por lo tanto la exposición del segundo anticuerpo com-
binado covalentemente con CNBr al antígeno es la misma. Sin
embargo, es evidente que el tamaño de la matriz influye so-
bre la actividad biológica del segundo anticuerpo covalente-
mente copulado con CNBr. Esta columna indica tres agrupamien-
15 tos básicos, a saber, celulosa microcristalina Tipo 50, ce-
lulosa microcristalina Tipo 20 y celulosa microcristalina
Tipo 50 que ha sido hidrolizada durante 4 horas o más. El
hecho básico de dicha columna es que no se puede recuperar
20 más actividad sacudiendo una matriz activada con CNBr que la
recuperada utilizando una celulosa microcristalina Tipo 50
que ha sido hidrolizada durante 4 horas.

25 En la columna titulada "Unidades de actividad recupera-
das sin sacudidas", entran en juego la capacidad de suspensión
de una partícula y, por lo tanto, el tamaño de la matriz,
así como la actividad biológica del segundo anticuerpo cova-
lentemente copulado. En esta columna se encuentran cuatro
subdivisiones, a saber, celulosa microcristalina Tipo 50,
celulosa microcristalina Tipo 20, celulosa microcristalina
30 Tipo 50 que ha sido hidrolizada durante 4 y 6 horas y celulo-

1 sa microcristalina Tipo 50 que ha sido hidrolizada durante
24 y 64 horas, encontrándose la actividad biológica máxima
en el último grupo.

5 Una comparación similar de la Tabla III pone de manifies-
to la sorprendente mejora de los nuevos combinados inmunoquí-
micos de esta invención sobre los combinados inmunoquímicos
de la Tabla II. La columna titulada "Unidades de actividad
recuperadas con sacudidas" contiene dos subgrupos básicos
en lugar de los tres que aparecen en la Tabla II. Es decir,
10 la celulosa microcristalina Tipo 50 difiere de la celulosa
microcristalina Tipo 20 y más pequeña. Esta diferencia impli-
ca que no se puede obtener más actividad biológica que la
recuperada cuando se utiliza una celulosa microcristalina
Tipo 20. Sin embargo, cuando se examina la columna titulada
15 "Unidades de actividad recuperadas sin sacudidas", se obser-
va que la columna está dividida en tres grupos, a saber, ce-
lulosa microcristalina Tipo 50, celulosa microcristalina Ti-
po 20 y celulosa microcristalina Tipo 50 que ha sido hidroli-
zada durante 4, 6, 24 o 64 horas. Por lo tanto, puede deducir-
20 se que, cuando se utiliza una celulosa microcristalina o un
polisacárido similar con una dimensión máxima de 18 micras o
menos, el tamaño de la matriz no es un factor limitante en
la determinación de las cantidades de actividad recuperadas.
Además, puede observarse que, aunque no se obtenga el grado
25 de actividad presente cuando se sacude, las unidades de acti-
vidad recuperadas sin sacudidas, utilizando cualquiera de
los nuevos combinados inmunoquímicos de esta invención, supe-
ran con mucho al número de unidades de actividad recuperada
sacudiendo cuando se utiliza un anticuerpo directamente copu-
30 lado a una matriz mediante el proceso con CNBr. La razón de

1 esta amplia mejora es que los combinados de esta invención
sitúan efectivamente el anticuerpo a una distancia separa-
da de la superficie de la matriz y con ello reducen el efec-
to y la influencia del tamaño de la matriz sobre la reacción
5 biológica. Además de separar el anticuerpo de la superficie
de la matriz, esta invención también copula el anticuerpo a
una matriz derivatizada mediante un agente copulante que,
como se ha indicado anteriormente, en la mayoría de los ca-
sos no afecta adversamente a la actividad inmunológica de
10 dicho anticuerpo.

Además de todo lo anterior, la mayor eficacia de los
nuevos combinados inmunoquímicos de esta invención permite
utilizar mayores tamaños de matriz en un procedimiento no
agitado, permitiendo con ello emplear un dispositivo de cen-
15 trifugación menos potente. La posibilidad de utilizar una cen-
trífuga menos potente es importante ya que, trabajando con
los nuevos combinados inmunológicos de esta invención, aho-
ra pueden utilizarse centrífugas convencionales de laborato-
rio y evitar así el elevado gasto en que se incurriría sin
20 se deseara practicar un método de la técnica anterior como
el de Chan y colaboradores.

Como se observa espectacularmente en la Tabla IV, se
obtiene un aumento del orden del 27 al 40 % utilizando los
nuevos combinados inmunoquímicos de esta invención en un pro-
25 cedimiento no agitado sobre el procedimiento agitado cuando
el anticuerpo es directamente copulado a una matriz mediante
el proceso con CNBr.

En la Tabla V se compara la eficacia de emplear los nue-
vos combinados inmunoquímicos de esta invención con el méto-
30 do convencional del doble anticuerpo de la técnica anterior,

1 en diversos ensayos de inmunoanálisis. Como se observa en la
Tabla V, los resultados obtenidos utilizando el nuevo método
y los nuevos combinados inmunoquímicos de esta invención pue-
den compararse favorablemente con el método de la técnica
5 anterior que utiliza el procedimiento convencional de doble
anticuerpo. Se observará que el RIA de la tiroxina mediante
el método convencional de doble anticuerpo dura unas 2 horas
mientras que un RIA empleando los nuevos combinados immuno-
químicos de esta invención solamente dura media hora.

10 EJEMPLO 9

Se añaden 3 ml de epíclorhidrina a una mezcla de 6 g de
celulosa microcristalina Tipo 50 (tamaño medio de partícula
50 micras) en 30 ml de hidróxido sódico 1N, con intensa agi-
tación a la temperatura ambiente. Al cabo de 2 horas, se se-
para el exceso de epíclorhidrina lavando con 1 litro de agua.
15 La matriz celulósica activada lavada se suspende después en
60 ml de una solución acuosa al 50 % de dimetilformamida. A
esta matriz activada en suspensión se añaden 0,85 g de 1,6-
hexanodiamina. Se deja que la reacción transcurra con agita-
ción durante 2 horas a la temperatura ambiente y después se
elimina el exceso de 1,6-hexanodiamina lavando con 1 litro
de una solución acuosa al 50 % de dimetilformamida. Después
de lavar con 1 litro de bicarbonato sódico 0,1M, la matriz
20 celulósica derivatizada se suspende en bicarbonato sódico
0,1M para formar una mezcla 1:1 de matriz derivatizada y bi-
carbonato sódico.

25 Se disuelven 0,80 g (3 milimoles) de suberimidato de
dimetilo (SDM) en 0,6 ml de solución de hidróxido sódico
5N fría, agitando a 4°C. Después de añadir bicarbonato sódico
30 0,1M frío, se ajusta el pH a 8,5 con hidróxido sódico 1N. A

1 esta solución se añaden 6 ml de bicarbonato sódico 0,1M con-
teniendo de 0,8 a 1,0 g de celulosa derivatizada y la mez-
cla se hace girar a 4°C durante 2 horas.

5 Después de separar el exceso de SDM, la matriz celuló-
sica derivatizada copulada se suspende en 9 ml de bicarbona-
to sódico 0,1M (4°C) y 1,3 ml de fracción de gamma-globuli-
na anti-conejo de cabra (36 a 38 mg/ml) en bicarbonato sódico
10 0,1M (4°C) y la mezcla se hace girar en un recinto frío.
El segundo anticuerpo inmovilizado se lava después bien con
carbonato sódico 0,1M y finalmente se suspende en tampón de
barbital, pH 8,0, que contiene 0,1 % de gelatina, para dar
un volumen final de 25 ml.

EJEMPLO 10

Procedimiento para la preparación de las columnas

15 Lavar previamente cada columna vacía con 1 ml de tampón
de barbital que contiene 0,1 % de gelatina y 2 % de ABS. En
tubos distintos, lavar celulosa fibrosa y celulosa microcris-
talina Tipo 50. Centrifugar las fracciones celulósicas y pre-
parar mezclas 1:1 (en volumen) de celulosa fibrosa/tampón
20 y celulosa microcristalina/tampón, donde dicho tampón es un
tampón de barbital que contiene 0,1 % de gelatina. Después
agregar volúmenes iguales de las mezclas de celulosa fibrosa
y celulosa microcristalina para formar una mezcla final que
puede ser utilizada como soporte para todas las columnas. Ca-
25 da columna contiene el equivalente de 1,4 ml de la mezcla
anterior más 200 λ de la dilución apropiada de anticuerpo pre-
cipitante en fase sólida. Esto da un volumen de retención de
300 μ l. A continuación, cada columna cargada es prelavada con
30 1 ml de dicho tampón de barbital conteniendo 0,1 % de gelati-
na y 2 % de ABS. Después se cierran las columnas para su alma-

1 cenamiento.

EJEMPLO 11

5

El RIA primario se realiza en un volumen final de 400 λ en un lugar alejado de la columna. La reacción primaria puede ser efectuada durante 0,5 a 5 horas, preferiblemente 0,5 a 1 hora. Después se aplica una parte alícuota de la mezcla de reacción primaria (300 λ) a la columna de segundo anticuerpo en fase sólida. Esta mezcla se deja incubar durante un período de 0,5 a 1 hora. A continuación la columna en fase sólida se lava con 1 a 3 ml de dicho tampón de barbital conteniendo 0,1 % de gelatina y 2 % de ABS para separar las fracciones libres de las combinadas. La columna que ahora solamente tiene las fracciones combinadas se tapa y se cuenta.

10

15

Los datos obtenidos realizando varios ensayos de acuerdo con los procedimientos generales descritos en los ejemplos anteriores se encuentran en la Tabla VI.

20

25

30

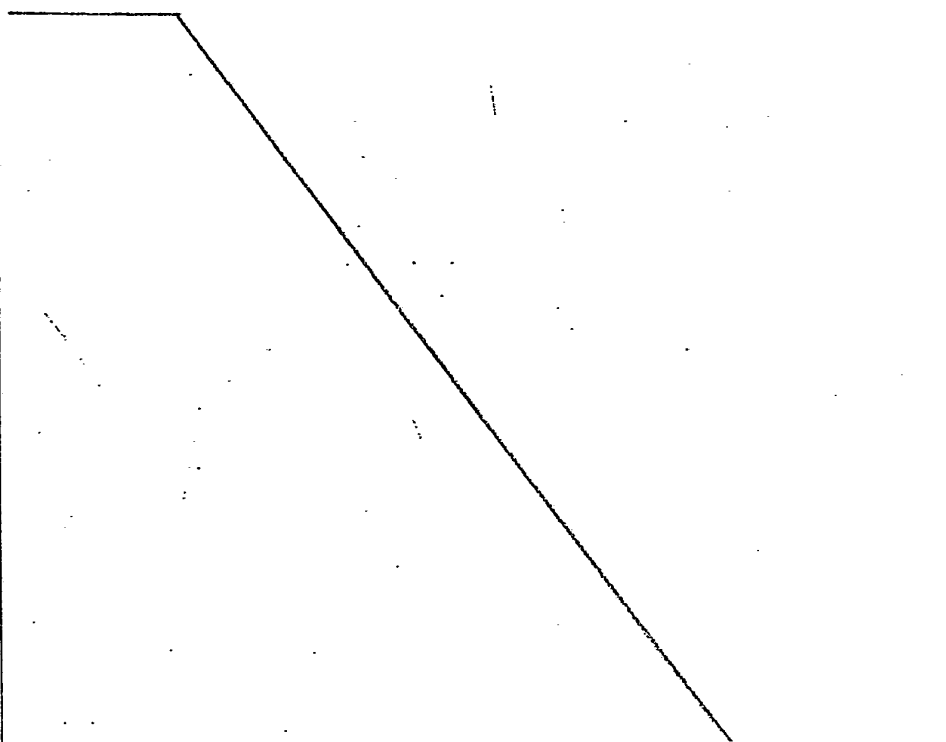


TABLA VI

	Tiempo de análisis primario a 37°, lejos de la columna, horas	Tiempo de incubación a la temperatura ambiente en la columna, horas	Sueros de control			
			Lederle I	Lederle II	Suero de control Ortho Beckman	Suero de control Ortho Beckman, diluido a 1/2
Digoxina (ng/ml)	1/2	1/2	1,23 (0,8-1,3)*	3,48 (3-3,8)	-	-
Tiroxina (µg/dl)	1/2	1/2	8,33 (6,4-9,6)	17,37 (13,6-22)	20,05 (12-20)	7,58 (6-7)
Triyodotironina	2	1/2	110,60 (98-118)	517,57 (409-457)	106,70 (90-110)	93,45 (70-90)
Hormona estimulante de la tirotrópina humana (micro-unidades internacionales/ml)	5	1	-	-	-	59,36 (40-75)

* Los valores entre paréntesis son los obtenidos con el método convencional del doble anticuerpo.

	Tiempo de análisis primario a 37°, lejos de la columna, horas	Tiempo de incubación a la temperatura ambiente sobre la columna, horas	Sueros de control		
			Suero de control triyodo-tironina Beckman	Ortho I	Ortho II
Digoxina (ng/ml)	1/2	1/2	-	-	-
Tiroxina (µg/dl)	1/2	1/2	-	-	-
Triyodotironina (ng/dl)	2	1/2	245,06 (165-225)	-	-
Hormona estimulante de la tirotrópina humana (micro-unidades internacionales/ml)	5	1	-	7,95 (3,9-7,9)	31,63 (23-39)

TABLA VI

1

5

10

15

20

25

30

	Tiempo de análisis primario a 37°, le- jos de la columna, horas	Tiempo de incu- bación a la tem- peratura ambien- te en la columna horas	Lederle I	Lederl
Digoxina (ng/ml)	1/2	1/2	1,23 (0,8-1,3)*	3 (3-3)
Tiroxina (µg/dl)	1/2	1/2	8,33 (6,4-9,6)	1 (13,
Triyodotironina	2	1/2	110,60 (98-118)	5 (409
Hormona estimulante de la tirotropina humana (mi- crounidades internaciona- les/ml)	5	1		-

* Los valores entre paréntesis son los obtenidos con el método convencio

	Tiempo de análisis primario a 37°, lejos de la columna, horas	Tiempo de incubación a la temperatura am- biente sobre la colum- na, horas	Suerc triyoc E
Digoxina (ng/ml)	1/2	1/2	
Tiroxina (µg/dl)	1/2	1/2	
Triyodotironina (ng/dl)	2	1/2	(16
Hormona estimulante de la tirotropina humana (mi- cro-unidades internaciona- les/ml)	5	1	

TABLA VI

Tiempo de incubación a la temperatura ambiente sobre la columna, horas	Sueros de control				
	Lederle I	Lederle II	Suero de control de tiroxina Beckman	Suero de control Beckman	Suero de control TSH Beckman, diluido a 1/2
1/2	1,23 (0,8-1,3) *	3,48 (3-3,8)	-	-	-
1/2	8,33 (6,4-9,6)	17,37 (13,6-22)	20,05 (12-20)	7,58 (6-7)	-
1/2	110,60 (98-118)	517,57 (409-457)	106,70 (90-110)	93,45 (70-90)	-
1	-	-	-	59,36 (40-75)	30,92

Los resultados con el método convencional del doble anticuerpo.

Tiempo de incubación a la temperatura ambiente sobre la columna, horas	Sueros de control		
	Suero de control triyodo-tironina Beckman	Ortho I	Ortho II
1/2	-	-	-
1/2	-	-	-
1/2	245,06 (165-225)	-	-
1	-	7,95 (3,9-7,9)	31,63 (23-39)

1

En la Tabla VI se comparan la eficacia de emplear los nuevos combinados inmunoquímicos de esta invención en un análisis en columna en fase sólida con la eficacia del método convencional de doble anticuerpo de la técnica anterior en diversos ensayos de inmunoanálisis. Como indica la Tabla VI, los resultados obtenidos utilizando el nuevo método y los nuevos combinados inmunoquímicos en columna en fase sólida de esta invención pueden compararse favorablemente con los resultados obtenidos en el método convencional del doble anticuerpo.

5

10

Además de presentar todas las ventajas de los procedimientos de inmunoanálisis en fase sólida, el nuevo procedimiento de inmunoanálisis en columna en fase sólida de esta invención elimina la necesidad de centrifugar y también se presta a la automatización.

15

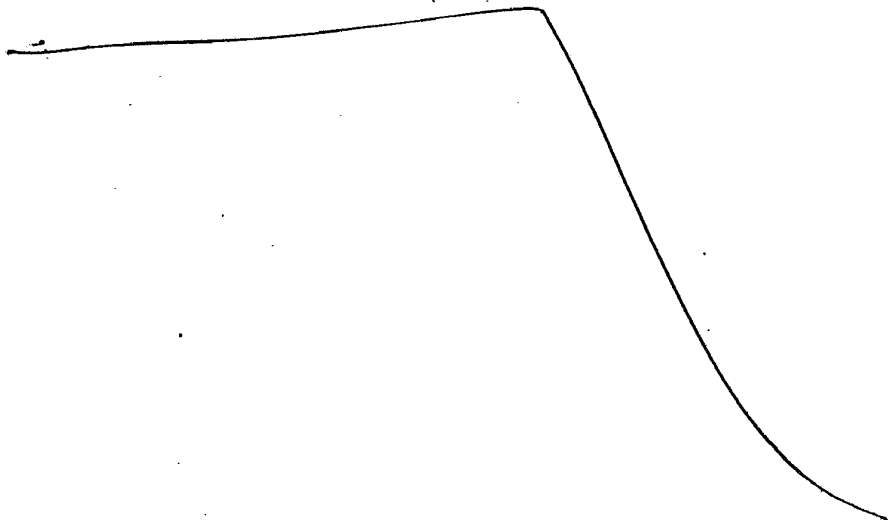
Basándose en este descubrimiento, los expertos en los procesos de inmunoanálisis podrán introducir otras muchas modificaciones y ramificaciones evidentes. Todas ellas están comprendidas dentro de los límites de esta invención.

20

En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

25

30



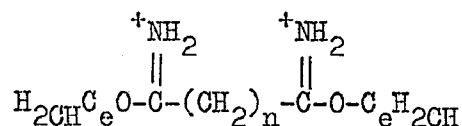
REIVINDICACIONES

1 1.- Un método y un aparato inmunológico de separación de fracciones libres de las combinadas en un proceso de inmunológico análisis, caracterizado dicho método porque comprende las etapas sucesivas de:

5 a) hacer reaccionar una matriz polisacárida con un reactivo activante, a un pH comprendido entre 7,5 y 10,0 aproximadamente, a la temperatura ambiente durante cinco minutos a cinco horas, para que la matriz se active;

10 b) hacer reaccionar la matriz activada procedente de la etapa anterior con el α, ω -diaminoseparador deseado, durante una a diez horas aproximadamente en presencia de un disolvente y a la temperatura ambiente, para derivatizar la matriz;

15 c) hacer reaccionar la matriz polisacárida derivatizada procedente de la etapa anterior con un agente copulante bifuncional que es un imido-éster o una mezcla de imidoésteres de fórmula



donde n es un número entero de 1 a 6 y e es 1 o 2, en presencia de un disolvente, en medio básico y haciendo girar la masa de reacción a 4°C aproximadamente, durante 1 a 5 horas;

25 d) hacer reaccionar la matriz polisacárida derivatizada copulada procedente de la etapa anterior con una función anticuerpo primario o secundario, en presencia de un disolvente, en medio tamponado y haciendo girar la masa de reacción durante 10 a 24 horas aproximadamente en un medio frío para obtener el combinado inmunológico deseado; y

30

1 el proceso de inmunoanálisis es en columna en fase sólida.

5 9.- Un método según la reivindicación 8, donde en la etapa e) se lleva a cabo una reacción primaria de inmunoanálisis fuera de dicha columna y después una parte alícuota de la mezcla de reacción citada se incuba sobre dicha columna de segundo anticuerpo en fase sólida.

10 10.- Un método según la reivindicación 9, donde en la etapa e) hay presente un exceso de dicho segundo anticuerpo en la columna en fase sólida.

15 11.- Un método según la reivindicación 8, donde en la etapa e) las columnas de segundo anticuerpo en fase sólida se cargan con anticuerpo primario, antígeno marcado y muestra y donde la etapa de reacción primaria y de incubación con el preparado sólido del segundo anticuerpo transcurren simultáneamente en el volumen vacío de la columna.

20 12.- Un método según la reivindicación 8, donde en la etapa e) el anticuerpo primario se incuba en la columna de segundo anticuerpo en fase sólida, produciendo con ello una columna de anticuerpo primario y donde el antígeno marcado y la muestra se incuban en dicha columna de anticuerpo primario.

25 13.- Un método según las reivindicaciones 1 a 12, donde el procedimiento de inmunoanálisis es un procedimiento de radioinmunoanálisis.

30 14.- Un método según la reivindicación 1, donde la matriz polisacárida se encuentra finamente dividida.

15
30 15.- Un aparato inmunoquímico para llevar a cabo el método de la reivindicaciones 1 a 14, que comprende una vasija de reacción y una multiplicidad de combinados inmunoquímicos, donde cada combinado inmunoquímico es el definido en la rei

1 vindicación 1.

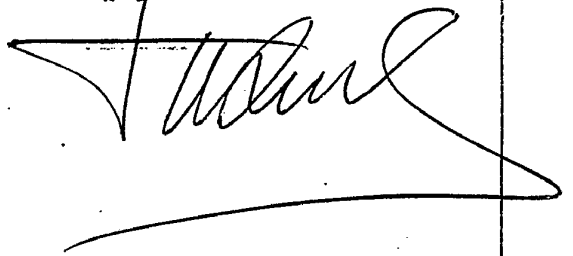
16.- Se reivindica por último como objeto sobre el
que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita
por: UN METODO Y UN APARATO INMUNOQUIMICO DE SEPARACION DE
5 FRACCIONES LIBRES DE LAS COMBINADAS EN UN PROCESO DE INMUNO
ANALISIS.

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la pre-
sente memoria descriptiva, que consta de cincuenta y una pa-
ginas mecanografiadas.

10

Madrid, 3 de Mayo de 1.977

BERNARDO UNGRIA
P.F.



15

20

25



30