



459943

(10) ES	(11) NUMERO	(10) A 1
(21)	459943	
(22)	FECHA DE PRESENTACION	
	20-6-77	

PATENTE DE INVENCION

5 NOV. 1978
con: ...
ante descripción y ...
tenido de la Memoria adjunta.

(30) PRIORIDADES: (31) NUMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
----------------------------------	------------	-----------

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

(64) TITULO DE LA INVENCION
"PROCEDIMIENTO PARA EL ENSAYO DE COMPUESTOS ACTIVOS FARMACOLOGICA, INMUNOLOGICA Y BIOQUIMICAMENTE EN LOS FLUIDOS BIOLÓGICOS"

(71) SOLICITANTE (S)
CHARLES L. MAIER, Jr.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
1905 Sylvan Terrace, Yardley, Pennsylvania, EE.UU.

(72) INVENTOR (ES)
el solicitante

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE
D. Juan Botella Pradillo

RESUMEN DEL DESCUBRIMIENTO

Una determinación de la presencia y cantidad de una sustancia orgánica específica (grupo coordinador) que formará un complejo con una macromolécula (anticuerpo) puede hacerse por medio de un reactivo obtenido mediante unión al grupo coordinador que va a ensayarse de una sustancia quimioluminiscente. La adición de una cantidad limitada de una sustancia (anticuerpo) que tiene receptores para el grupo coordinador junto con el grupo coordinador irradiado quimioluminiscente al fluido que va a ensayarse trae como resultado una reacción competitiva entre el grupo coordinador presente en el fluido y el grupo coordinador irradiado quimioluminiscente para el número limitado de lugares receptores. En condiciones de equilibrio, la cantidad del grupo coordinador irradiado quimioluminiscente unida al anticuerpo se relaciona con la cantidad de grupo coordinador no irradiado existente en la solución que se ensaya, y se determina mediante el aislamiento del anticuerpo y medición de su quimioluminiscencia o por aislamiento y medición del resto de grupo coordinador irradiado libre.

FUNDAMENTO DE LA INVENCION

1. Terreno de aplicación de la invención.-

Los métodos disponibles para la rápida determinación cuantitativa o cualitativa de sustancias biológicamente activas a concentraciones extremadamente bajas, son de un número limitado. El diagnóstico del médico acerca del paciente o la confirmación del diagnóstico frecuentemente implican la detección y/o cuantificación de una o más sustancias en fluidos corporales tales como la saliva, sangre u orina. La capacidad para detectar rápidamente en los fluidos cor-

porales la presencia y cantidades de tales materiales, que pueden ser sintetizados naturalmente por el cuerpo o ingeridos, es a menudo crítica para la vida del paciente. Entre tales materiales se incluirían, pero no se limitarían a, -
5 las hormonas tanto de tipo esteroide como polipéptido, prostaglandinas, toxinas y otras sustancias que pueden estar implicadas en las funciones corporales, tales como la tiroxina, triyoditironina, etc. El método de ensayo, para ser útil al médico, deberá ser capaz de establecer una diferenciación entre diferencias extremadamente pequeñas en las -
10 concentraciones o cantidades de la sustancia

2. Descripción de técnicas anteriores

En el pasado, se ha empleado diversos métodos para - el ensayo de los fluidos corporales, notablemente el radioensayo, el radioinmunoensayo, la cromatografía de capa fina
15 y el ensayo de encima amplificado.

El procedimiento del radioinmunoensayo ha sido descrito por Murphy, Journal, Clinical Endocrinology, 27, 973 - (1967); Ibid, 28, 234 (1968). El empleo de la técnica de -
20 un radioensayo o radioinmunoensayo adolece de varias desventajas entre las que se encuentran los riesgos asociados con o inherentes a las sustancias radioactivas, los problemas de manipulación asociados, la inestabilidad, la necesidad de un equipo costoso para la realización de los ensayo y -
25 las dificultades asociadas con la manipulación y separación de las formas libre y combinada de la sustancia irradiada.

Los procedimientos de cromatografía de capa fina están descritos por Stahl, Thin Layer Chromatography, Springer Verlag, New York, 1969.

30 El empleo de métodos dependientes de la cromatografía

de capa fina para el análisis de cantidades traza de materiales requiere un alto grado de pericia en la ejecución de la técnica, una cualificación que limita la utilidad del método en general. Además, el método es frecuentemente demasiado lento en el desarrollo del cromatograma, es sensible a una variedad de factores interfirientes y adolece de fluctuaciones en la gama de sus características de ejecución o confiabilidad.

Un ensayo por amplificación de enzima se describe por Rubenstein y Ullman, en la Patente de los Estados Unidos - número 3819837. El empleo de esta técnica requiere la precisa y delicada manipulación de reactivos biológicos de una naturaleza extremadamente compleja, tanto con respecto a su preparación como a su almacenamiento y utilización. Así - pues, en virtud de su complejidad y susceptibilidad potencial a las variaciones de las condiciones ambientales, los ensayos mediante amplificación de enzimas no han demostrado ser completamente satisfactorios con respecto a sensibilidad y especificidad.

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención - es proporcionar un método mejorado que detecte y determine con precisión pequeñas cantidades de sustancias orgánicas en los fluidos corporales.

Otros objetivos, ventajas y características nuevas - de la invención se harán aparentes mediante la siguiente - descripción cuando se considere en conjunción con los dibujos acompañantes, en los que:

La Figura 1 es un diagrama sinóptico del procedimiento de ensayo de la presente invención;

La Figura 2 es un gráfico que muestra el cambio en -

la actividad quimioluminiscente en fracciones sucesivas de grupo coordinador irradiado en filtración de gela;

La Figura 3 es una curva standard desarrollada de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo I; y

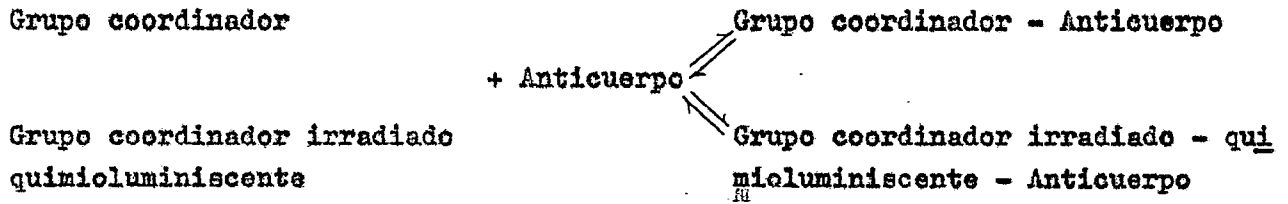
5 La Figura 4 es una curva standard desarrollada de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo II.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona al médico y al laboratorio clínico reactivos y un método útil para la detección y ensayo de cantidades extremadamente pequeñas (del orden de 5 - 25 ng/ml) de una amplia gama de compuestos orgánicos existentes en los fluidos corporales. Los reactivos de la presente invención se preparan partiendo del compuesto orgánico que va a detectarse en el ensayo al fijar al mismo un compuesto (tal como el Luminol) que sea capaz de emitir luz. A partir de ahora, y durante toda la especificación, al compuesto orgánico que va a detectarse se hará referencia como el grupo coordinador, (o grupo coordinador no irradiado). Los reactivos de la presente invención son complejos formados al hacer reaccionar un grupo coordinador con un compuesto orgánico que tiene el mismo potencial de luz y al que generalmente se hará referencia en toda esta especificación como grupo coordinador irradiado quimioluminiscente, o grupo coordinador irradiado.

25 El método de ensayo reivindicado como invención mía se basa en una reacción inmunológica competitiva entre un anticuerpo y el grupo coordinador, y el grupo coordinador y el cuerpo coordinador irradiado como se evidencia en la siguiente ecuación:

30



5 El grupo coordinador presente en el suero del paciente, plasma, orina y otro fluido corporal rivaliza con el grupo coordinador irradiado quimioluminiscente por el número limitado de receptores disponibles con lo cual se reduce la cantidad de grupo coordinador quimioluminiscente unido al anticuerpo. En las condiciones de equilibrio, por lo tanto, el nivel de actividad quimioluminiscente unida se relaciona inversamente con la concentración de grupo coordinador en el paciente como muestra o standard. Después de una adecuada incubación para conseguir el equilibrio, las fracciones libres y unidas se separan, activándose la fracción libre o unida y cuantificando su emisión de luz.

15 DESCRIPCION DE LAS MATERIALIZACIONES FISICAS ESPECIFICAS

Esta invención proporciona reactivos adecuados y un método para detectar o ensayar cantidades tan pequeñas como de 5 - 25 ng/ml de una amplia variedad de materiales orgánicos al relacionar la presencia de un caso particular desconocido a la actividad quimioluminiscente.

20 Pueden emplearse diversos métodos para ensayar una amplia variedad de grupos coordinadores. Normalmente, el grupo coordinados, el grupo coordinador irradiado quimioluminiscente y el receptor deberán ser solubles en el medio empleado. El procedimiento es hacer reaccionar con un anticuerpo adecuado, simultáneamente o en secuencia, el grupo coordinador y el grupo coordinador irradiado en condiciones

que permitan la reacción competitiva entre el grupo coordinador irradiado y el no irradiado en los lugares receptores de una sustancia de unión hasta que se produzca el equilibrio. La separación física del grupo coordinador unido y el grupo coordinador irradiado del grupo coordinador no unido y el grupo coordinador irradiado, permite activar la irradiación de cualquiera de las especies irradiadas unidas o no unidas.

En casos específicos, el método de activación puede servir como base para la separación funcional o discriminación entre el grupo coordinador irradiado quimioluminiscente unido y aquella porción del conjunto del grupo coordinador irradiado que no está asociada o unida a un receptor. En otros casos la precisión puede requerir que el grupo coordinador unido y el grupo coordinador irradiado no unido estén físicamente separados del grupo coordinador no unido y el grupo coordinador y el grupo coordinador irradiado no unido.

Al medir la actividad quimioluminiscente del grupo coordinador irradiado, se añaden al medio sustancias, que serán denominadas activadores. La emisión de luz resultante se detecta y registra. En la mayoría de los casos, es deseable registrar la fase de emisión completa o la actividad quimioluminiscente total que puede variar desde 100-500 milisegundos a 3-5 minutos ó más. Alternativamente, si la secuencia activación-emisión es rápida, puede ser satisfactorio registrar la altura máxima de la emisión. Al medir las características de emisión del conjunto irradiado, puede determinarse la cantidad de sustancia irradiada presente.

La concentración de los grupos coordinadores irradiados quimioluminiscentes utilizados para el ensayo o determinación puede variar ampliamente y dependerá de una variedad de factores tales como la sensibilidad del sistema de detección y el número de moléculas quimioluminiscentes fijadas a una molécula del grupo coordinador, factor al que aquí desde ahora en adelante se hará referencia como "relación de irradiación". Además, la concentración de la sustancia, que va a detectarse o cuantificarse influirá también en los niveles e concentración de los reactivos empleados para esa prueba particular.

No puede fijarse un límite superior a la cantidad de grupo coordinador que puede determinarse de acuerdo con la presente invención debido a que existen muchas técnicas para la dilución o atenuación del sistema de detección de la señal que impedirían la interferencia si están presentes - excesivos niveles de concentraciones o grupos coordinadores irradiados. El límite inferior de las concentraciones de grupo coordinador irradiado que puede corrientemente emplearse para los ensayos está limitado únicamente por la cantidad mínima de sustancia quimioluminiscente que puede detectarse por los instrumentos de fotodetección. Dado que pueden fijarse múltiples moléculas quimioluminiscentes a una sola molécula del grupo coordinador y se han desarrollado instrumentos de fotodetección que detectarán cantidades tan pequeñas como 10^{-12} moles de sustancias luminiscentes, el método de ensayo de la presente invención tiene una amplia aplicación.

Dentro de determinados límites, relativos a las características físicas y químicas del medio, la naturaleza de -

la activación y el proceso de separación cuanto mayor sea el número de moléculas quimioluminiscentes fijadas a una molécula particular del grupo coordinador (la relación de irradiación) mayor será la sensibilidad del ensayo. En casos tales en los que se desean irradiados múltiples, la fijación del irradiado puede realizarse directamente por su combinación con el grupo coordinador, o alternativamente, varias moléculas quimioluminiscentes pueden fijarse primero a una molécula portadora que está, a su vez enlazada al grupo coordinador.

La sustancia de unión deberá ser una que sea específica para el grupo coordinador, es decir, capaz de unirse únicamente a ese grupo coordinador particular y su conjugado irradiado quimioluminiscente.

La concentración de la sustancia de unión empleada para una prueba particular estará generalmente relacionada con la gama de concentraciones del grupo coordinador que van a ensayarse. En la mayoría de los casos, la solución del grupo coordinador puede utilizarse directamente, con la excepción de aquellas situaciones en las que una concentración relativamente elevada del grupo coordinador está presente. En tales circunstancias, la solución desconocida puede diluirse hasta proporcionar una concentración conveniente para el ensayo.

Generalmente, las concentraciones de los reactivos, con la excepción de la solución del grupo coordinador no irradiada, se mantienen constantes. Las soluciones anticuerpo que van a emplearse pueden adquirirse comercialmente o prepararse por técnicas inmunológicas conocidas. Sólo se requiere un pequeño volumen y se mantiene a las condiciones

adecuadas de pH, resistencia iónica y la temperatura adecuada para su actividad. Los ensayos, generalmente, deberán llevarse a cabo en condiciones de temperatura moderada que se extiendan desde 10° a 50°C, a un pH dentro de la ga
5 ma de 5 a 10, y más a menudo de 6 a 9. Las sustancias amor-
tiguadoras adecuadas para el método de la presente inven-
ción son el carbonato, borato, fosfato, (trishidroximetil)
aminometano y el acetato.

La manera de detectar la actividad del irradiado qui
10 mioluminiscente puede consistir en la detección directa de
la reacción quimioluminiscente por medición de la luz visi
ble emitida a la activación o la actividad del irradiado -
quimioluminiscente puede determinarse por métodos indirectos
tales como la fluorometría. La elección de las condicio
15 nes específicas a emplear para el ensayo dependerán de los
requisitos y condiciones específicas implicados. No obstan
te, normalmente, serán utilizados medios hidrofílicos, par
ticularmente medios acuosos. Pueden estar presentes otros
líquidos, por ejemplo co-disolventes tales como alcoholes,
20 éteres, cetonas, amidas, etc.; la elección particular de -
las condiciones e ingredientes del medio dependerán de la
composición particular de los reactivos que vayan a emplear
se en el ensayo.

Con respecto a la composición de los reactivos que -
25 van a utilizarse en el ensayo, deberá observarse que puede
resultar deseable emplear más de un tipo de grupo coordina
dor irradiado o receptor en la realización del ensayo. El
empleo de varias soluciones anticuerpo diferentes, por e-
jemplo, permitiría examinar una variedad de sustancias si-
30 multáneamente.

LOS GRUPOS COORDINADORES

Aquellos materiales de una naturaleza biológica, bioquímica o farmacológica que han demostrado ser grupos coordinadores adecuados, en la práctica de mi invención, son a aquellos materiales para los que pueden encontrarse un adecuado receptor o agente de unión que proporcione una especificidad y afinidad satisfactoria para el grupo coordinador. Tales coordinadores para los que pueden hacerse disponibles los receptores se extienden desde simples moléculas, tales como las fenilalkilaminas, especialmente la anfetamina, y los barbituratos hasta a aquellas moléculas que poseen un elevado orden de complejidad, por ejemplo las proteínas.

Los anticuerpos capaces de unirse específicamente con un grupo coordinador pueden producirse por la introducción de ese grupo coordinador (si es antigénico) dentro del cuerpo o corriente sanguínea de un vertebrado. Además, grupos coordinadores no-antigénicos que están unidos a otras sustancias que son antigénicas pueden introducirse en la circulación o cuerpo de un vertebrado, resultando la producción de anticuerpos a aquel material que tienen lugares receptores para el grupo coordinador.

Otra categoría de grupos coordinadores, basados en la naturaleza del receptor, es esa extensa clase de sustancias o grupos coordinadores para los que están disponibles receptores que se producen naturalmente. En tales casos, el receptor se produce en un organismo vivo y puede aislarse por algún método o conjunto de procedimientos en una forma específica para el grupo coordinador. Deberá entenderse que los materiales de interés biológico, bioquímico o farmacológico pueden tener receptores que se produzcan natural

mente y tambien actuar como haptenos cuando se unen a un receptor o molécula portadora, tal como una proteína.

Representantes de los grupos coordinadores a las que puede unirse material quimioluminiscente, por diversos métodos de acuerdo con la presente invención, son:

Drogas de Clase I, sus metabolitos o derivados y análogos.

Esta clase incluye los alcaloides, por ejemplo, opáceos, tales como la morfina, heroína y otros compuestos de composición similar, así como los análogos de estas drogas; meperidina y sus análogos, catecolaminas; barbituratos; glutetámid; cocaína y sus metabolitos y análogos; difenilhidantoina; marihuana, tranquilizantes, por ejemplo meprobamato, los benzodiazocicloheptanos, tambien conocido como librium, fenotiazinas, etc.

Aminoácidos Clase II, polipéptidos y proteínas que incluyen: proteínas tales como la hemoglobina, enzimas, así como mioglobina que incluye anticuerpos y componentes de inmunorespuesta. Tambien están incluidas las hormonas tales como la hormona adrenocorticotrofica (ACTH), oxitocina, hormona luteinizante, insulina, gonadotropina coriónica, gonadotropina pituitaria, hormona del crecimiento, renina bradiquinina, angiotensina, hormona estimuladora del folículo y tiroxina de unión con glubulina, así como otras sustancias de origen y/o efectos de origen derivado biológicamente, por ejemplo, tiroxina, triyoditironina, etc.

Clase III Esteroides, que incluyen:

Los estrógenos, gestrógenos, andrógenos, hormonas adrenocorticales, glicósidos cardiotónicos de ácidos biliares, agliconas así como saponinas. Como ejemplos especifi-

cos de tales materiales se citan los siguientes compuestos representativos: testosterona, androsterona, equilenina, - estrona, estriol, progesterona, pregnenolona, 17-hidroxi-
5 deoxi-corticosterona, cortisol, aldosterona, digitoxina, - digoxina, digoxigenina, digitoxigenina, etc.

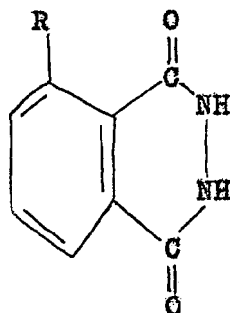
Clase IV Vitaminas, que prepresentan un grupo de com-
puestos, que incluye: la vitamina A, el grupo de la vitami-
na B, las vitaminas D, vitaminas E y K, así como sustancias
heterogéneas de importancia biológica; los antibióticos, -
10 por ejemplo, penicilina, tetraciclina, actinomicina, ácidos
nucleicos, polinucleotidos, nucleosidos, serotonina, (3-(2
aminoetil)5-hidroxiindole, espermina, galactosa, ácido fenil-
pirúvico, pesticidas, fungicidas, nematocidas, células vi-
vientes o no vivientes, derivados de diversos orígenes, in-
15 cluyendo los bacteriales, protozoarios, plantas algáceas, -
con origen en vertebrados y no vertebrados; virus y partí-
culas virales, porciones o extractos derivados de células,
virus; productos biológicos derivados como consecuencia de
o indicativos de una condición o variedad de condiciones -
20 específicas fisiológicas, tales como la alfa feto proteína
antígenos cercincoembrionicos, Dane Cores, etc.

LAS SUSTANCIAS QUIMIO-LUMINISCENTES

La sustancia quimioluminiscente utilizada en la pre-
sente invención es preferiblemente luminol (5-amino-2, 3-di-
25 hidro-1, 4-efthalazinediona) puesto que el luminol es el que
mejor se adapta para producir resultados cuantitativos y -
cualitativos. Otros materiales quimioluminiscentes que pue-
den ser utilizados dentro del alcance de la presente inven-
ción incluyen el tetrabis (dimetilamino) etileno, luciferi-
30 na (de origen bacterial o producido por las luciérnagas), -

el lucigenin (nitrato de dimetil diacridinio) y el oxalil cloruro. Tambien son útiles las 2, 3-dihidroftalazina-1, 4-dionas que poseén la siguiente fórmula estructural general:

5



10

En la que R puede ser: NH_2 ; NCH_3 ; NHC_2H_5 ; $\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$; NHCOCH_2Cl ; $\text{NHCOCH}_2\text{NH}_2$; $\text{NHCOCH}_2\text{NHNH}_2$; $\text{N}(\text{CH}_3)_2$; $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$; $\text{N}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5)_2$

15

El luminol está representado por la fórmula anterior en la que $\text{R} = \text{NH}_2$.

20

El material quimioluminiscente puede estar fijado o unido directamente al grupo coordinador o análogo del grupo coordinador, o en algunos casos está unido al grupo coordinador o análogo del grupo coordinador a través de un agente adecuado de acoplamiento que puede actuar como medio de fijación de la sustancia quimioluminiscente al grupo coordinador. Un agente adecuado de acoplamiento es uno que no afecte adversamente a las propiedades quimioluminiscentes y biológicas del grupo coordinador irradiado.

25

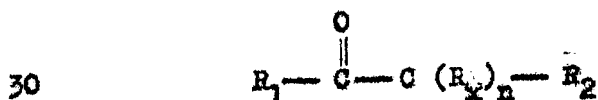
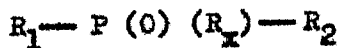
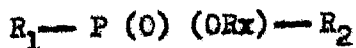
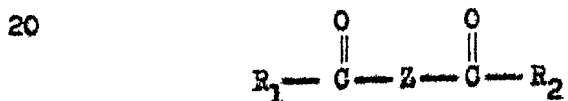
El grupo funcional que se utiliza para conjugar la sustancia quimioluminiscente es, en el caso del luminol, el grupo amino. En otros compuestos, tales como el luciferin, la conjugación se produce a través del grupo hidroxilo. En general, las sustancias quimioluminiscentes que tienen un grupo amino o un grupo carboxilo forman conjugados más es-

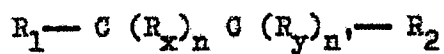
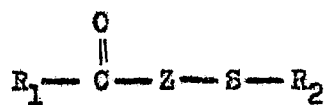
30

tables con el grupo coordinador. También se posible modificar el grupo funcional de una sustancia quimioluminiscente para proporcionar una unión más estable al grupo coordinador sin afectar su actividad quimioluminiscente.

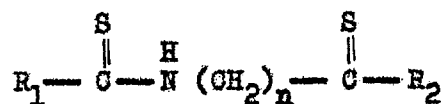
5 El grupo de enlace que puede emplearse para la conjugación de la molécula quimioluminiscente al grupo coordinador puede variar en tamaño desde uno a treinta átomos, y puede incluir uno o varios de los átomos de carbono, nitrógeno, fósforo, hidrógeno, azufre y oxígeno.

10 Ejemplos, de conjugación entre un grupo coordinador (R_1), que posee un grupo amino o hidroxilo y una sustancia quimioluminiscente (R_2) con los mismos grupos funcionales se ilustran en las siguientes fórmulas:

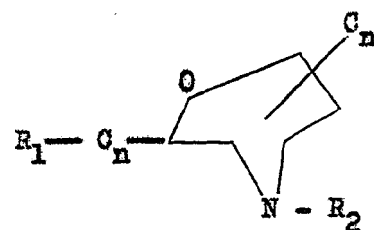
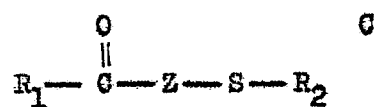




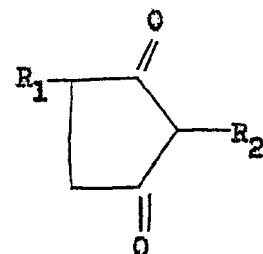
5



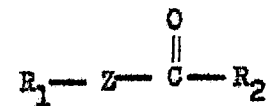
10



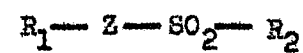
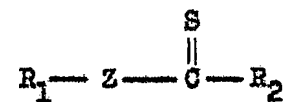
15



20



25



30

En las que Z es un grupo hidrocarburo bivalente.
Como un ejemplo de la reacción de conjugación el -

5-amino-2, 3-dihidro-1, 4-ftalazinodiona, (luminol) puede unirse a través del grupo amino. La conjugación directa de la molécula de luminol puede realizarse por una variedad de métodos. Por ejemplo, reacción del grupo amino del luminol con thionil cloruro, con la formación del derivado isotiocianato, y la subsiguiente adición del grupo coordinador que posea un grupo amino reactivo, resultado la formación del derivado tiourea.

En el caso específico que el grupo coordinador posee un grupo ceto, este grupo puede condensarse con el grupo amino del luminol, por tratamiento del grupo coordinador con O-carboximetil hidroxilamina hasta formar el derivado carboxi metil oxima.

Si un grupo carboxilo está presente en el grupo coordinador, puede evidenciarse como conveniente acoplar directamente el grupo coordinador con la molécula de luminol mediante el empleo de un reactivo tal como N-etil - 3-dimetilaminopropil carbodiimida ó 1-ciclo-3-(2-morfolinoetil)-carbodiimida.

De la adición del reactivo carbodiimida al grupo coordinador, que posee el grupo carboxilo, resulta la formación de O-acilisurea derivada, que reaccionará con el grupo amino del luminol para efectuar la conjugación. Alternativamente, el N-etil-5-fenilsoxazolid-3 sulfonato (Reactivo K de Woodward) puede utilizarse para la conjugación directa del grupo coordinador con el luminol.

La presencia de grupos hidroxilo, en el caso del azúcares y sus derivados, puede permitir el empleo de un reactivo tal como el bromuro de cianógeno para la conjugación. El azúcar reaccionará con el bromuro de cianógeno, en con-

diciones apropiadas de pH, hasta formar el imidocarbonato que reaccionará con el luminol, para producir bien el imidocarbonato N-sustituido ó un carbamato N-sustituido.

5 Un procedimiento alternativo para el acoplamiento del grupo coordinador al luminol, en aquellas situaciones en las que el grupo coordinador posee grupos hidroxilo, como es el caso de los azúcares, es el empleo de reactivos tales como el cloruro cianúrico (2,4,5-tricloro-1,3,5-triazina) u otros derivados apropiados de la triazina, tales como la 10 2-amino-4,6-bicloro-s-triazina. Un derivado del triazinil del azúcar es la primera fase de esta reacción, seguida por la adición y enlace de la molécula de luminol a través de su grupoamino.

15 Diversos reactivos bifuncionales tales como el glutaraldehído pueden también emplearse para la conjugación de una sustancia quimioluminiscente tal como el luminol, a un grupo coordinador. En condiciones apropiadas de pH y concentración, la adición del luminol al grupo amino del grupo coordinador se produce con una o más de una molécula del 20 glutaraldehído actuando como portadora o puente así como agente de enlace.

ACTIVACION

Pueden utilizarse una variedad de sustancias, aisladas o juntas, para despertar la actividad quimioluminiscente del compuesto(s) irradiado. Las siguientes sustancias se 25 han encontrado adecuadas como activadores para la práctica de la presente invención:

- 1 Peróxido de hidrógeno (H_2O_2);
 - 2 Hipoclorito (ClO);
 - 3 Hidróxido de sodio (NaOH),
- 30

- 4 Metales tales como el hierro (Fe^{+3}), Niquel (Ni), cobalto (Co);
- 5 Estructuras que contienen hierro, tales como las -
5 profirinas y estructuras relacionadas (hemoglobina, citocromos, mioglobina);
- 6 Polivinilpirrolidona y otras estructuras similares de actividad y estructura similar;
- 7 Riboflavina, y otros materiales similares que posean propiedades similares, utilizados por separado o -
10 juntos en las reacciones de reducción-oxidación; y
- 8 Persulfato de amoniaco y compuestos de naturaleza similar.

Los siguientes ejemplos se ofrecen con objeto de que la efectividad de la presente invención pueda ser más total
15 mente comprendida. Estos ejemplos se exponen únicamente con fines de ilustración y no se destinan a limitar en modo al
guno la práctica de la invención.

EJEMPLO 1 - DETERMINACION DE INSULINA EN PLASMA SANGUINEO

A. Preparación de insulina - Luminol conjugado

20 Un conjugado insulina-luminol caracterizado por una relación de irradiación de 1:10 se preparó mediante disolución de 2,605 partes por peso de Luminol en una cantidad -
mínima de 0,01 hidróxido de sodio normal en solución. La -
solución de Luminol se diluyó hasta 1.000 partes por volu-
25 men con 0,1 amortiguador fosfato molar (pH 7,7).

A la solución de Luminol se añadió con agitación un volumen igual de una insulina preparada mediante disolución de 4,454 partes por peso de insulina bovina en 1.000 partes por volumen de un amortiguador fosfato molar 0,1 (pH 7,7).
30 La conjugación se inició con la adición gota a gota de 200

partes por volumen de una solución acuosa al 25 por ciento de glutaraldehído. El frasco de la reacción se protegió de la luz y se dejó que la reacción continuara durante 18 horas a 25°C.

5 El conjugado insulina-luminol se separó de la mezcla de reacción por filtración en gela a través de una columna de 2,5 cm por 80 cm de SEPHADEX G-10 (un polisacárido degradado) con etileno clorihidrina disponible en Pharmacia Fine Chemicals, de Piscataway, New Jersey).

10 La columna estaba equilibrada con 0,1 M de amortiguador fosfato (pH 7,2) y la mezcla de reacción se recogió a un caudal de 15 ml/hr.

Partes alicuotas del efluente se verificaron para su actividad quimioluminiscente en un contador de escintilación PACKAR TRICARB. Una porción (0,1 ml) de cada alícuota se añade a un tubo de ensayo de poliestireno y se diluye a hasta 2 ml con agua destilada. El tubo de ensayo se coloca en el contador de escintilación (con el circuito de coincidencia desconectado).

15

20 Se preparó un activador por mezcla de soluciones acuosas conteniendo un 0,3% de ferrocianuro potásico (0,75 ml), un 30% de peróxido de hidrógeno (0,25 ml) y un 10% de sucrosa (1 ml). Esta solución activadora se introdujo cuidadosamente por pipeta dentro del tubo de ensayo de poliestireno debajo de la superficie del conjugado insulina-luminol para formar dos capas.

25

La difusión a través de la zona límite entre el conjugado de insulina-luminol en la capa superior y el activador en la capa inferior produjo como resultado quimioluminiscencia que se midió por el contador de escintilación. -

30

La cuenta total durante un período de dos minutos que comen
zó 30 segundos despues de la introducción del activador se
registra y representa gráficamente en la Figura 2. Se obser
vará en la Figura 2 que la actividad quimioluminiscente cae
5 bruscamente con la cuarta fracción. Las primeras cuatro ali
cuotas se combinan y este conjugado de insulina-luminol en
solución se diluye con 9 partes por volumen de amortiguador
fosfato 0,1 molar (pH 7,2) que sántiene 5 mg/ml de albúmina
de suero bovino y se valora en relación con cantidades co-
10 nocidas de insulina para desarrollar una curva que puede u
tilizarse en el ensayo cuantitativo rápido de composiciones
desconocidas.

B. Preparación de la curva standard

(a) Dieciocho tubos de poliestireno numerados se la-
15 van con una solución al 5% de albúmina de suero bovino pre
parada en amortiguador fosfato 0,04 M (pH 7,4).

(b) A 16 de los tubos numerados se añaden 600 μ l de
0,04 M de amortiguador fosfato (pH 7,4) que contiene 5 mg/
ml de albúmina, Todos los tubos se mantienen a la tempera-
20 tura ambiente.

(c) Una y cuatro décimas de mililitro de amortiguador
fosfato 0,04 M (pH 7,4) se añaden a los tubos numerados 17
y 18.

(d) Se prepara una solución de insulina humana al di
25 solver 1000mU 5g de insulina humana en 0,1 M de amortigua-
dor fosfato (pH 7,7) hasta un volumen final de 10 ml (Solu
ción A). Una dilución de la solución de insulina (Solución
A) se hace por adición de un volumen de la solución de insu
lina a nueve volúmenes de 0,1 M amortiguador fosfato de pH
30 7,7 hasta producir una concentración final de 10 mU/ml (So

lución B). Estas soluciones standard de insulina se añaden a los tubos de ensayo numerados como sigue:

<u>NO. del tubo</u>	<u>Insulina Standard</u>	<u>Insulina como NU/tubo</u>
5,6	50 ul Sol. B	0.5
7,8	100 ul Sol. B	1.0
9,10	200 ul Sol. B	2.0
11,12	300 ul Sol. B	3.0
13,14	50 ul Sol. A	5.0
15,16	100 ul Sol. A	10.0

10 (e) A los tubos 3 hasta 16 se añaden 2000 ul de Insulin Antiserum agitado la mezcla suavemente para evitar la formación de espuma.

15 (f) A cada uno de los tubos 1 hasta 18 se añaden 200 ul del conjugado insulina-luminol preparado como se ha descrito anteriormente en este ejemplo. Cada tubo se agita suavemente para mezclar los contenidos sin formación de espuma y se tapan.

(g) Los tubos 1 hasta 18 se refrigeran a 2 - 4°C durante cinco horas.

20 (h) A cada uno de los tubos 1 hasta 18 se añaden con mezcla 100 ul de un suero sustituto preparado por disolución al 4% por peso de albúmina de suero bovino y al 3% por peso de gammaglobulina bovina en 0,04 M de amortiguador fosfato (pH 7,4).

25 ; (i) A cada uno de los tubos 1 hasta 16 se añaden 0,5 de suspensión de carbón revestido Dextran (Schwarz/mann), y los tubos se mezclan por agitación hasta obtener una suspensión uniforme de carbón.

30 Estos tubos se mantienen a la temperatura ambiente durante 10 minutos y entonces se centrifugan a 2500 rpm du

rante 25 minutos. El líquido flotante claro de cada tubo de ensayo se decanta dentro de un tubo numerado correspondiente de plástico tratado con albúmina de suero bovino como en el paso (a).

5 La actividad quimioluminiscente de cada muestra se determina en un espectrofotómetro de doble haz registrador de la relación Perkin-Elmer Modelo 124 equipado con un registrador en banda de papel y una sección de detección por tubo fotomultiplicador.

10 El tubo se coloca en la ranura de salida y las ranuras de entrada de la luz se bloquean. Un activador de hipoclorito de sodio (1 ml. de solución de hidróxido de sodio normal 0,05 que contiene un 0,5 por ciento por peso de hipoclorito de sodio) se introduce dentro del tubo de muestra a través de una tubería de plástico de pequeña sección interior de una manera que presente la integridad de hermeticidad a la luz del compartimiento de muestra mientras que permite la introducción de la solución activadora dentro de la cubeta de muestra. El espectrofotómetro está conectado al modo de detección de energía y ajustado para una máxima amplificación. La emisión detectada total se registra por medio de un registrador en banda de papel y se cuantifica por la integración electrónica de la zona situada debajo de la curva. Los valores de emisión (V_e) obtenidos de la lectura se representan promediados en la Tabla I.

25

T A B L A I

<u>No. del tubo</u>	<u>Promedio de la cuenta total (Zona de la curva)</u>	<u>Porcentaje de la actividad irradiada total</u>	<u>Cantidad de es pecies no irra diadas</u>
1 - 2	0	0	uu/ml
3 - 4	10,591	40.8	Irradiado total unido por el gru pe coordinador
5 - 6	9,614	37.1	0.5 uu/ml
7 - 8	7,309	28.2	1.0
9 - 10	6,220	24.0	2.0
11 - 12	5,993	23.1	3.0
13 - 14	5,708	22.0	5.0
15 - 16	5,668	21.8	10.0
17 - 18	25,945	100	Actividad irradiada total del con- jugado insulina- luminol

Una curva de valoración se construye al representar -
gráficamente el porcentaje de la actividad irradiada total -
para cada tubo de muestra (conteniendo una cantidad conoci-
da de insulina). Esta representación de los datos de la Ta-
5 bla I se reproduce en la Figura 3.

Al utilizar el procedimiento de ensayo descrito ante-
riormente, la cantidad de insulina de una muestra desconoci-
da puede determinarse rápidamente por la interceptación del
"porcentaje unido" con la curva standard de la Figura 3.

10 C. Ensayo clínico

Se lavan cuatro tubos de poliestireno numerados con u
na solución de albúmina de suero bovino al 5% preparada en
0,04 M de amortiguador fosfato (pH 7,4).

(a) Se añadieron alícuotas de suero humano a estos tu-
15 bos numerados de poliestireno como se indica a continuación

<u>No. del tubo</u>	<u>Volumen de suero</u>
19,20	100 ul
21,22	25 ul

Los tubos 21 y 22 se recomendaron para un ensayo clínico en
20 que se anticipaba una concentración de insulina en exceso -
de 20 nU/ml.

(b) A cada tubo se añadieron 800 ul de 0,4 M de amor-
tiguador fosfato (pH 7,4) que contenía un 5% de albúmina bo-
vida por litro y 100 ul de antisuero insulínico. Los tubos
25 se mezclaron suavemente para evitar la formación de espuma.

(c) A cada tubo se añadieron 200 ul del conjugado in-
sulina-luminol preparado como se describe anteriormente en
este ejemplo. Los tubos se agitaron suavemente para evitar -
la formación de espuma, cada tubo se tapó y se refrigeró a
30 2 - 4°C durante 4,5 horas.

(d) Setenta y cinco microlitros del suero sustituto - que contenían un 4 por ciento de albúmina de suero bovino y un 3% de gammaglobulina bovina en 0,04 de amortiguador fosfato (pH 7,4) se añadieron a los tubos 21 y 22 mezclándose a fondo.

5

(e) A cada uno de los tubos 19 hasta 22 se añadieron 0,5 ml de una suspensión de carbón revestido Dextran (Schwarz/mann) y los tubos se mezclaron por agitación para obtener una suspensión uniforme del carbón. Estos tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 minutos, y entonces se centrifugaron a 2500 rpm durante 25 minutos. El material flotante claro de cada tubo se decantó dentro de un tubo de plástico numerado correspondientemente que había sido lavado con albúmina de suero bovino al 5% en un amortiguador fosfato 0,04 (pH 7,4).

10

15

La quimioluminiscencia emitida por cada tubo que contenía una solución decantada cuando se colocaba en un espectrofotómetro Perkin-Almer y se activaba como se ha descrito anteriormente, está resumida en la Tabla II

20

T A B L A II

<u>No. del tubo</u>	<u>Cuenta total promedio (zona de la curva)</u>	<u>Porcentaje de actividad irradiada total</u>	<u>Cantidad de especies no irradiadas.</u>
19 - 20	5,953	22.9	uU/ml
21 - 22	9,370	36.0	3.02 0.73

25

La curva standard muestra que el 36% es equivalente a un nivel de insulina de 0,48 uU insulina/tubo. La insulina calculada como uU/ml de suero (100 ul de suero tomado como muestra) es:

$$uU/tubo \times 10 = 0,48 \times 10 = 4,8 uU/ml$$

30

EJEMPLO II - PROCEDIMIENTO PARA EL ENSAYO CUANTITATIVO DE LOS

NIVELES DE DIGOXINA EN SUERO

A. Preparación del conjugado Digoxina-Luminol.

Un conjugado de Digoxina-Luminol caracterizado por una relación de irradiación de 1:1 se prepara disolviendo -
5 1,00 partes por peso de Digoxina en 0,1 M de amortiguador -
sulfato. La solución de digoxina se diluye hasta 500 partes
por volumen con amortiguador acetato adicional y se añade -
metanol suficiente hasta hacer llegar el volumen final de -
la solución a 1000 partes. Esta solución se protege de la -
10 luz mientras se añaden 4,53 mg de periodato de sodio y la -
mezcla se agita a 25^o C durante 90 minutos. Al final de este
tiempo se añaden 10 ml de una solución que contiene 0,454 -
mg/ml de luminol. La solución de luminol se prepara disolviendo
do 0,453 gramos de luminol den la cantidad mínima de 0,05 N
15 hidróxido de sodio y se diluye con 0,1 M de amortiguador a-
cetato (pH 9,5) hasta un volumen final de 1 litro. La agita
ción se continua a 25^o C durante 120 minutos adicionales y
se añaden 100 mg de borohidrido de sodio a la mezcla de reac
20 ción. La agitación se continúa a 25^o C druante otras 18 ho-
ras. Un mililitro de una solución de glicol etileno al 15%
en 0,1 M de amortiguador acetato (pH 9,5) se añade entonces
a la mezcla de reacción, reduciéndose la temperatura a 4^o C
y continuando la agitación durante otras 48 horas.

La separación del conjugado digoxina-luminol de la mez
25 cla de reacción se consigue por filtración selectiva a trav
vés de un conjunto filtro AMINCO UM-2 bajo 60 libras de ni-
trógeno con adición continua de amortiguador fresco. El pH
del amortiguador añadido se disminuye gradualmente desde 9,5
a 7,4 durante el procedimiento de filtración que se lleva a
30 cabo durante 5 días y al final de cuyo tiempo el filtrado -

no exhibía más quimioluminiscencia cuando se activaba con un reactivo de hipoclorito alcalino.

El conjugado Digoxina-Luminol (retenido por el filtro) se disuelve en 100 partes por volumen de 0,1 M de amortiguador fosfato (pH 7,4) conteniendo 5 mg/ml de albúmina de suero bovino y se valoriza en relación con cantidades conocidas de digoxina para desarrollar una curva que puede emplearse en el ensayo rápido cuantitativo de composiciones desconocidas.

10 B. Preparación de la curva standard

La curva standard se desarrolló por el procedimiento descrito en el anterior Ejemplo IB.

15 (a) A 16 tubos de poliestireno numerados (lavados con albúmina de suero bovino como se describe en el Ejemplo IB) se añade una solución de 200 ul de un suero humano standard que se sabe libre de digoxina, glicosidos u otras sustancias que pudieran interferir con el ensayo.

(b) A los tubos 1 y 2 se añaden 50 ul de 0,01 M amortiguador fosfato en 0,15 M salina (pH 7,4).

20 (c) A los tubos 1 hasta 16 se añaden 1 ml de 0,01 M amortiguador fosfato en 0,15 M salina (pH 7,4).

(d) Una solución standard de digoxina en un 30% de etanol (disponible comercialmente en Schwartz/Mann) se vuelve a diluir con una solución compuesta de un 30% de etanol en 0,01 M salina amortiguadora fosfato (0,15 salina, pH 7,4) - para producir una serie de standards que contienen de 0,4 ng/ml a 10 ng/ml de digoxina. Estas soluciones standard se añaden como sigue:

	<u>Tubo</u>	<u>Volumen</u>	<u>Concentración</u>
30	5,6	50 ml	0.4 ng/ml

	7,8	50 ul	1.0
	9,10	50 ul	2.0
	11,12	50 ul	3.0
	13,14	50 ul	5.0
5	15,16	50 ul	10.0

(e) A los tubos 3 hasta 16 se añaden 20 ul del conjugado digoxina-luminol preparado como se describe anteriormente en este ejemplo.

10 (f) A los tubos 1 hasta 14 se añaden 20 ul de digoxina antisera. Los tubos se mezclan bien por agitación y se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos después de la adición de la antisera.

15 La actividad quimioluminiscente de cada muestra se determina en un espectrofotómetro de registro de relación de haz doble PE Modelo 124 como se describe en el Ejemplo 1 anteriormente. 100 mililitros de una solución de hemoglobina preparada por disolución de 0,1 g de hemoglobina bobina en 1 litro de 0,1 M amortiguador botado (pH 10) se añaden al tubo 1, el tubo se coloca en el espectrofotómetro y un minuto después de la adición de la hemoglobina se añaden 200 ul de fluido activador, una solución de peróxido de hidrógeno al 5% en 0,1 M de amortiguador borato (pH 10,0) se añade. -
20 La emisión total detectada se registra en un registrador de banda de papel y se cuantifica por la integración electrónica de la zona bajo la curva.
25

El procedimiento descrito en el párrafo precedente se repite con los tubos 1 hasta 16 y se registra la emisión total de cada muestra. Estos valores (V_e) obtenidos de la lectura se promedian en la Tabla III.

T A B L A I I I

<u>No. del Tubo</u>	<u>Promedio de la cuenta total del integrador</u>	<u>Porcentaje de acti vidad irradiada to tal</u>	<u>Cantidad de digoxina no irradiada (ng/ml)</u>
1,2	265	100	Conteo total
3,4	234	88.3	Total irradiado unido por grupo coordinador
5,6	211.7	79.8	0.08 ng/ml
7,8	194.7	73.5	0.20 ng/ml
9,10	164.1	61.9	0.40 mg/ml
11,12	138.4	52.2	0.60 ng/ml
13,14	121.6	45.9	1.0 ng/ml
15,16	94.4	35.6	2.0 ng/ml

Una curva de valoración se construye representando gráficamente el porcentaje de la actividad total irradiada para cada tubo de muestra (que contiene una cantidad conocida de digoxina). La representación gráfica de los datos contenidos en la Tabla III se reproduce en la Figura 4.

C. Ensayo clínico

(1) Dos tubos numerados de poliestireno (17 y 18) se lavan con una solución de albúmina de suero bovino como se describe anteriormente en el Ejemplo I C.

10 (2) Doscientos microlitros de suero humano que van a ensayarse para el contenido en digoxina se añaden a los tubos 17 y 18.

(3) Los tubos 17 y 18 se incrementan con 1 ml de 0,01 M (pH 7,4) de amortiguador fosfato en 0,15 N de salina.

15 (4) A los tubos 17 y 18 se añaden 20 ul del conjugado digoxina-luminol preparado como se describe anteriormente en este Ejemplo.

20 (5) A los tubos 17 y 18 se añaden 20 ul de digoxina-antisuero. Ambos tubos se mezclan bien por agitación y se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos después de la adición del antisuero.

25 (6) Cien microlitros de una solución de hemoglobina descrita anteriormente en el párrafo B de este Ejemplo, se añaden a los tubos 17 y 18. Los tubos se colocan en el espectrofotómetro y un minuto después de la adición de la hemoglobina a cada uno de ellos, se añaden 200 ul del fluido activador descrito anteriormente en la Sección B de este Ejemplo. El promedio de la emisión total, V_e , descubierto es de 151,3 unidades integradoras.

30 La interceptación del valor de la emisión media para

los tubos 17 y 18 de la curva standard de la Figura 4 indica la digoxina presente en el suero ensayado a un nivel de 0,50 ng/ml.

EJEMPLO III - ENSAYO CUANTITATIVO DE LOS NIVELES DE DIGOXINA EN SUERO

5 El proceso descrito anteriormente en el Ejemplo II -
puede modificarse para reducir o eliminar cualquier actividad inhibidora, si está presente, en el suero humano, plasma u otro fluido corporal que vaya a ensayarse, por la adición al suero u otro fluido corporal en cada tubo de muestra (del 1 hasta el 18) la siguiente adición del 0,01 M de amortiguador fosfato en 0,15 M de salina, 100 ul de la fracción globulina de un antisuero de suero anti-humano.

10 Deberá entenderse que el descubrimiento que anteriormente se ha especificado es a modo de ejemplo concreto y que pueden efectuarse numerosas modificaciones y variaciones dentro del campo de aplicación de esta invención. Los procesos descritos en los ejemplos específicos anteriores pueden modificarse o realizarse mediante muchas técnicas standard -

15 bien conocidas cuando se desée, mediante un tratamiento especial del suero, plasma o fluidos corporales como prerequisite para la realización de un ensayo o utilización posterior. Tal tratamiento especializado puede incluir, por ejemplo, la filtración mecánica, la diálisis u otros métodos bien conocidos de separación molecular. También son posibles

20 numerosas variaciones o modificaciones con respecto al formato físico de los ensayos que incluyen la utilización de diversos tipos de partículas, añadidas a las soluciones de ensayo o sistemas de reacción con la intención de separar física o funcionalmente el grupo coordinador irradiado aso

25

30

ciado con el anticuerpo del grupo coordinador irradiado li
bre (no asociado con el anticuerpo).

5 Tales sistemas de partícula, a modo de ilustración,
pueden consistir en partículas o tubos de carbón revestido
Dextran, partículas o tubos de dextran a los que se ha uni
do un anticuerpo, a los bien conocidos procedimientos median
te partículas de látex.

Así pues, la presente invención está limitada única-
mente al alcance expuesto en las reivindicaciones anejas.

REIVINDICACIONES

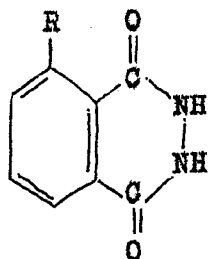
5 1.- Procedimiento para el ensayo de compuestos activos farmacológica, inmunológica y bioquímicamente en los fluidos biológicos, caracterizado por el conjugado de una sustancia quimioluminiscente como grupo que tiene una actividad luminiscente medible por medios fotosensibles en el que dicho grupo coordinador es insulina y dicha sustancia quimioluminiscente es luminol.

10 2.- Procedimiento para el ensayo de compuestos activos farmacológica, inmunológica y bioquímicamente en los fluidos biológicos, según reivindicación 1 caracterizado por un conjugado de una sustancia quimioluminiscente como grupo coordinador activo farmacológica, inmunológica o bioquímicamente que tiene una actividad luminiscente medible
15 por medios fotosensibles en el que dicho grupo coordinador es digoxina y dicha sustancia luminiscente es luminol.

20 3.- Procedimiento para el ensayo de compuestos activos farmacológica, inmunológica y bioquímicamente en los fluidos biológicos, según reivindicaciones anteriores caracterizado por un conjugado de una sustancia quimioluminiscente como grupo coordinador activo farmacológica, inmunológica o bioquímicamente que tiene una actividad luminiscente medible por medios fotosensibles en el que dicho grupo coordinador se selecciona del grupo compuesto de drogas,
25 aminoácidos, esteroides, vitaminas A y D y E y K, antibióticos, ácidos nucleicos, polinucleótidos, nucleosidos, sacáridos, serotonina, (3, 2 aminoetil)-5 hidroxindole, espermina, galactosa, ácido fenilpirúvico, pesticidas, fungicidas, nematocidas, células y extractos celulares, virus y
30 partículas de virus y dicha sustancia quimioluminiscente -

se selecciona del grupo compuesto por 2,3-dihidroftalizinina
-1,4-dionas de la siguiente fórmula general:

5



10

En la que R es: NH_2 ; NCH_3 ; NEC_2H_5 ; $\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$; NHCOCH_2Cl ; -
 $\text{NHCOCH}_2\text{NH}_2$; $\text{NHCOCH}_2\text{NHNH}_2$; $\text{N}(\text{CH}_3)_2$; $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$; $\text{N}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5)_2$; -
y tetrakis (dimetilamina), etileno, luciferina, lucigenina
y oxalil cloruro.

15

4.- Procedimiento para el ensayo de compuestos acti-
vos farmacologica, inmunologica y bioquimicamente en los -
fluidos biológicos, caracterizado por el grupo coordinador
quimioluminiscente conjugado de la reivindicación 3, en el
que dichas drogas incluyen sus metabolitos, derivados y a-
nálogos y están seleccionadas del grupo compuesto por alcalo-
ides, meperidina, catecolaminas, barbituratos, glutetimi-
da, cocaína, difenil-hidantoina, marihuana y tranquilizan-
tes; incluyendo los dichos aminoácidos polipéptidos y pro-
teinas seleccionadas del grupo compuesto por hemoglobina,-
enzimas, mioglobina, anticuerpos, componentes de inmunorreg-
puesta, hormonas, insulina, gonadotropina coriónica, gona-
dotropina pituitaria, hormona del crecimiento, renina bradi-
kinina, angiotensin, globulina de unión con tiroxina foli-
cular, tiroxina y triyodotironina; y dichos esteroides es-
tán seleccionados del grupo compuesto por estrógenos, ges-
trogenos, androgenos, hormonas adrenocorticales, ácidos bi-
liares, glicósidos cardiotónicos, agliconas, saponinas, in-
cluyendo testosterona, androsterona, equilenina, estrona, y

20

25

30

estriol, progesterona, pregnenolona, 17-hidroxideoxi-cortico-
sterona, cortisol aldosterona, digitoxina, digoxinadigo-
xigena y digitoxigenina.

5 5.- Procedimiento para el ensayo de compuestos acti-
vos farmacologica, inmunologica y bioquimicamente en los -
fluidos biológicos, según reivindicaciones anteriores, ca-
racterizado por un conjugado de insulina-luminol preparado
por la reacción del luminol con la insulina en presencia -
de glutaraldehído.

10 6.- Procedimiento para el ensayo de compuestos acti-
vos farmacologica, inmunologica y bioquimicamente en los -
fluidos biológicos, caracterizado por el conjugado de insu-
lina-luminol de la reivindicación 5 que tiene una relación
de irradiación de alrededor de 1:10.

15 7.- Procedimiento para el ensayo de compuestos acti-
vos farmacologica, inmunologica y bioquimicamente en los -
fluidos biológicos, según reivindicaciones anteriores, ca-
racterizado porque el método de activación de un conjugado
de insulina-luminol que comprende la adición a aquél de u-
na solución que contiene un álcali metal ferricianuro y pe-
20 róxido de hidrógeno.

 8.- Procedimiento para el ensayo de compuestos acti-
vos farmacologica, inmunologica y bioquimicamente en los -
fluidos biológicos, según reivindicaciones anteriores, carac-
25 terizado porque El método de activación de un conjugado de
insulina-luminol que comprende la adición a aquél de un -
álcali metal hipoclorito.

 9.- Procedimiento para el ensayo de compuestos acti-
vos farmacologica, inmunologica y bioquimicamente en los -
30 fluidos biológicos, según reivindicaciones anteriores, ca-

racterizado por un conjugado de digoxina-luminol preparado por la reacción de la digoxina con luminol en presencia de un álcali metal periodato y la adición de un álcali metal borohidrido a la mezcla de reacción así obtenida.

5 10.- Procedimiento para el ensayo de compuestos acti
vos farmacologica, inmunologica y bioquimicamente en los -
fluidos biológicos, caracterizado por el conjugado de digo
xina-luminol de la reivindicación 9 que tiene una relación
de irradiación de alrededor de 1:1.

10 11.- Procedimiento para el ensayo de compuestos acti
vos farmacologica, inmunologica y bioquimicamente en los -
fluidos biológicos, según reivindicaciones anteriores carac
terizado porque el método de activación de un conjugado de
digoxina-luminol que comprende la adición a aquél de peró
xido de hidrógeno y hemoglobina.

15 12.- Procedimiento para el ensayo de compuestos acti
vos farmacologica, inmunologica y bioquimicamente en los -
fluidos biológicos, según reivindicaciones anteriores, ca
racterizado porque un método de determinar la presencia de
un grupo coordinador en un medio que se sospecha contiene
20 dicho grupo coordinador que comprende; colocarlos juntos -
en una zona líquida acuosa (1) dicho medio, (2) un grupo -
coordinador irradiado quimioluminiscente y (3) una sustan
cia de unión soluble que tiene lugares capaces de unirse ú
nicamente a dicho grupo coordinador y a la porción del gru
25 po coordinador de dicho grupo coordinador irradiado quimio
luminiscente; siendo la concentración de dicha sustancia -
de unión tal que existen insuficientes lugares receptores
para combinarse con todos los dichos grupos coordinadores
30 irradiados presentes en las tres mezclas componentes; y a-

nalizar en dicha zona el efecto de dicho medio en la cantidad de medio coordinador irradiado quimioluminiscente unido a dicha sustancia de unión.

5 13.- Procedimiento para el ensayo de compuestos activos farmacologica, inmunologica y bioquimicamente en los fluidos biológicos, caracterizado por un método de acuerdo con la reivindicación 12 en el que dicho grupo coordinador es insulina.

10 14.- Procedimiento para el ensayo de compuestos activos farmacologica, inmunologica y bioquimicamente en los fluidos biológicos, caracterizado por un método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho grupo coordinador irradiado quimioluminiscente es un conjugado de insulina-luminol.

15 15.- Procedimiento para el ensayo de compuestos activos farmacologica, inmunologica y bioquimicamente en los fluidos biológicos, caracterizado por un método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicho grupo coordinador es digoxina.

20 16.- Procedimiento para el ensayo de compuestos activos farmacologica, inmunologica y bioquimicamente en los fluidos biológicos, caracterizado por un método de acuerdo con la reivindicación 15 en el que dicho grupo coordinador irradiado quimioluminiscente es un conjugado de digoxina-luminol.

25 17.- Procedimiento para el ensayo de compuestos activos farmacologica, inmunologica y bioquimicamente en los fluidos biológicos, caracterizado por un método de acuerdo con la reivindicación 12 en el que dicha sustancia de unión es un anticuerpo.

30

18.- Procedimiento para el ensayo de compuestos acti
vos farmacologica, inmunologica y bioquimicamente en los fl
uidos biológicos, caracterizado por un método de acuerdo
con la reivindicación 12 en el que dicho grupo coordinador
5 es una droga, su análogo o metabolito.

19.- Procedimiento para el ensayo de compuestos acti
vos farmacologica, inmunologica y bioquimicamente en los fl
uidos biológicos, caracterizado por un método de acuerdo
con la reivindicación 18 en el que dicha droga está selec-
20 cionada del grupo compuesto de alcaloides, morfina, heroi-
na, meperidina, catecolaminas, barbituratos, glutetimida,
cacaina, defenil-hidantoina, marijuana, tranquilizantes, -
neprobamato, los benzodiazociacloheptanos, fenotiozinas y
metabolitos o análogos de los mismos.

20.- Procedimiento para el ensayo de compuestos acti
vos farmacologica, inmunologica y bioquimicamente en los fl
uidos biológicos, caracterizado por un método de acuerdo
con la reivindicación 12 en el que dicho grupo coordinador
15 es una proteina.

21.- Procedimiento para el ensayo de compuestos acti
vos farmacologica, inmunologica y bioquimicamente en los fl
uidos biológicos, caracterizado por un método de acuerdo
con la reivindicación 20 en el que dicha proteina se selec-
20 ciona del grupo formado por polipéptidos, hemoglobina, en-
zimas, mioglobina, anticuerpos, componentes inmunoresponsa-
bles, hormonas, ACTG, oxitocina, hormona luteinizante, in-
25 sulina, gonadotropina coriónica, gonadotropina pituitaria,
hormonas del crecimiento, renin bradikinina, angiotensina,
hormonas estimuladora del folículo y globulina de unión ti
30 roxina.

22.- Procedimiento para el ensayo de compuestos acti
vos farmacologica, inmunologica y bioquimicamente en los -
fluidos biológicos, caracterizado por un método de acuerdo
con la reivindicación 12 en el que dicho grupo coordinador
es un esteroide.

5

23.- Procedimiento para el ensayo de compuestos acti
vos farmacologica, inmunologica y bioquimicamente en los -
fluidos biológicos, caracterizado por un método de acuerdo
con la reivindicación 12 en el que dicho grupo coordinador
es una vitamina.

10

24.- Procedimiento para el ensayo de compuestos acti
vos farmacologica, inmunologica y bioquimicamente en los -
fluidos biológicos, caracterizado por el método de la rei-
vindicación 12, en el que dicha sustancia de unión está ais-
lada y la cantidad de grupo coordinador quimiluminiscente
unida a aquella se determina por la adición de un activador
y midiendo la luz emitida.

15

25.- Procedimiento para el ensayo de compuestos acti
vos farmacologica, inmunologica y bioquimicamente en los -
fluidos biológicos, según reivindicaciones anteriores, ca-
racterizado porque una sustancia inmunológicamente activa
como grupo coordinador conjugado quimiluminiscente que tie-
ne actividad luminiscente medible por medios fotosensibles.

20

26.- PROCEDIMIENTO PARA EL ENSAYO DE COMPUESTOS ACTI
VOS FARMACOLOGICA, INMUNOLOGICA Y BIOQUIMICAMENTE EN LOS -
FLUIDOS BIOLOGICOS.

25

Todo conforme se describe en la Memoria que antecede
se ilustra como ejemplo de ejecución en los planos unidos
a ella y se reivindica.

30

Esta Memoria consta de cuarenta y una hojas, foliadas

escritas a máquina por una sólo cara y planos que la acompañan.

Madrid, 20 de Junio de 1977

CHARLES L. MAIER, Jr.

P.A.


Fig. 1

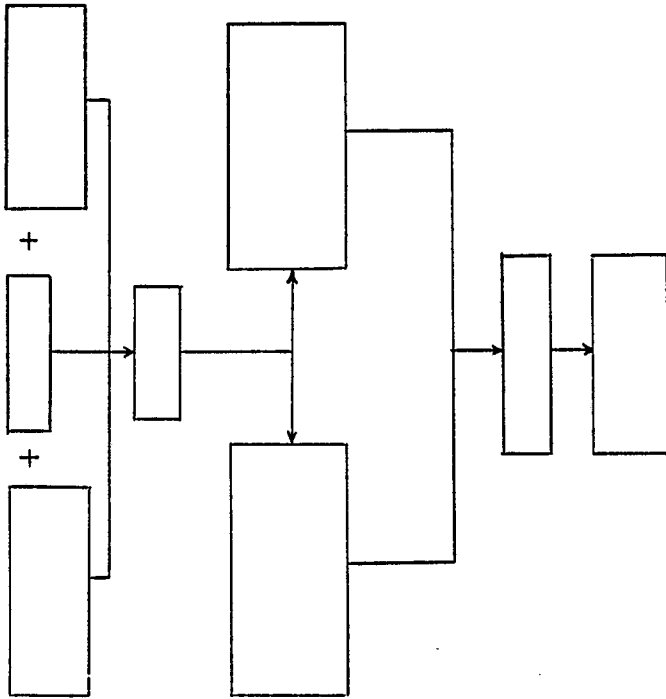


Fig. 3.

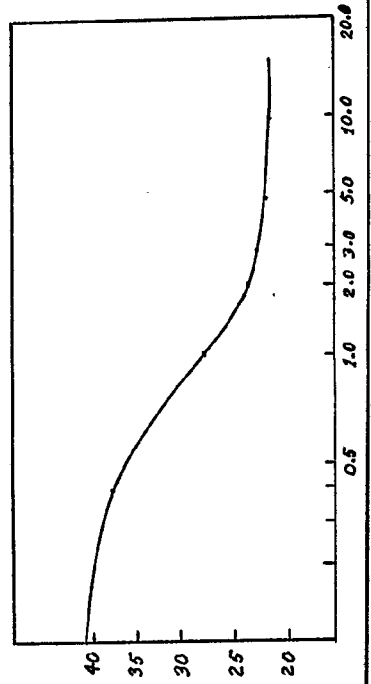
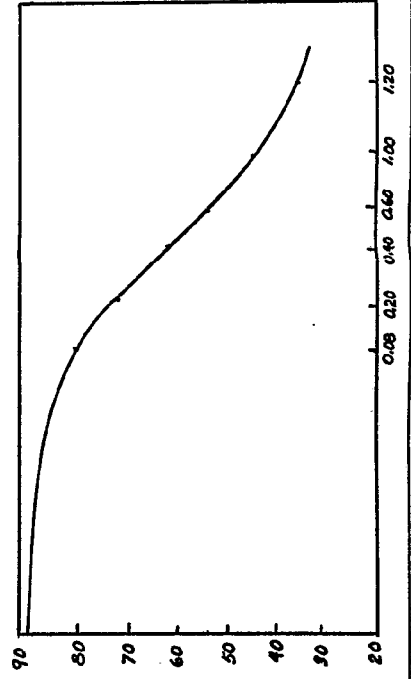


Fig. 4.



ESCALA VARIABLE
 FROM 20 JUN. 1977
 (with a scribble over the text)

Fig. 2.

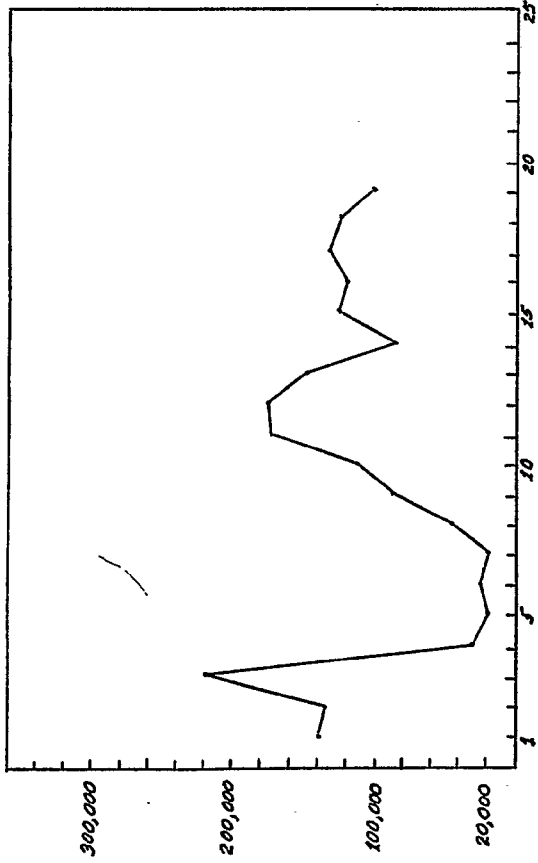


Fig. 1

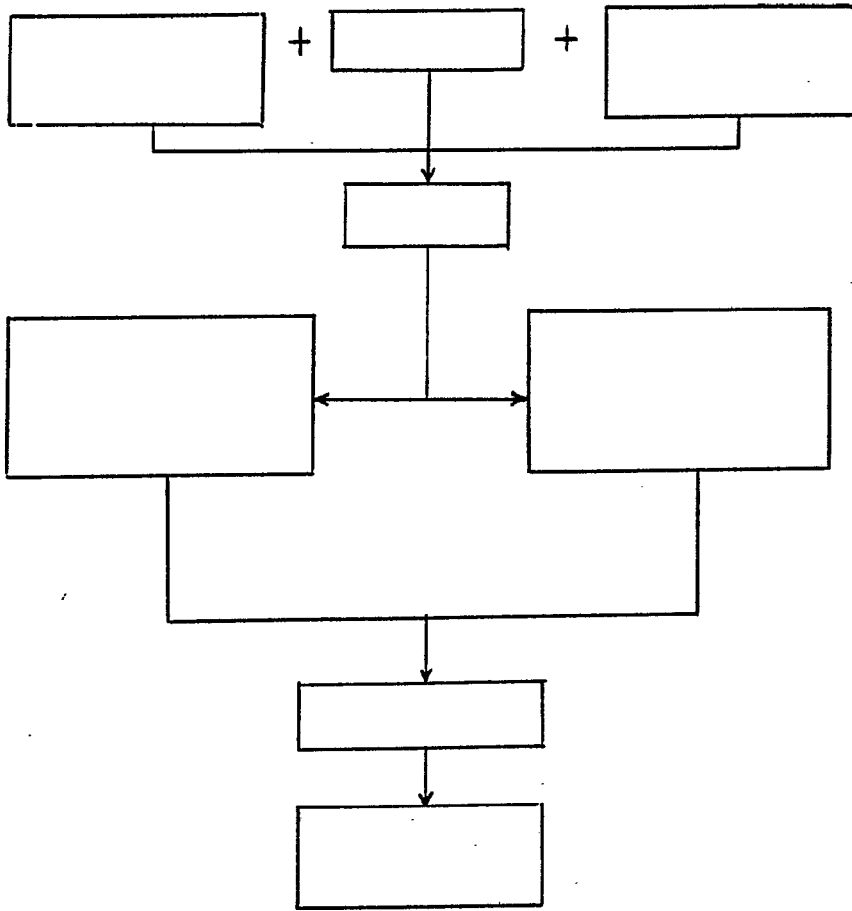


Fig. 3.

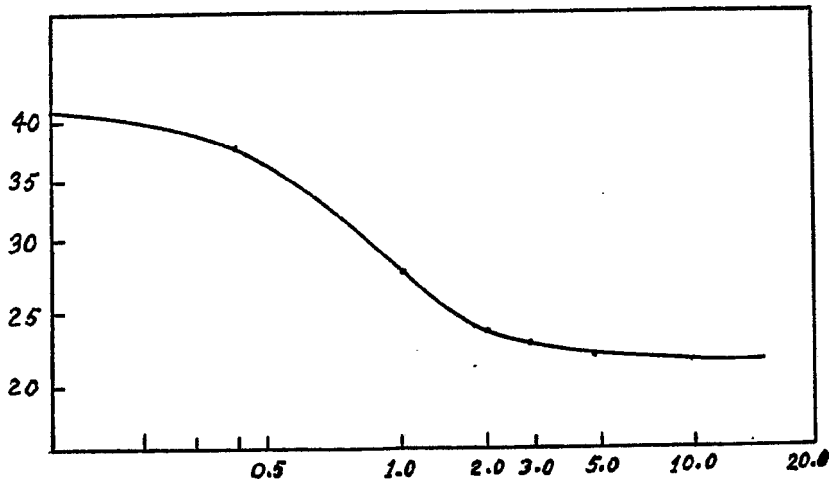
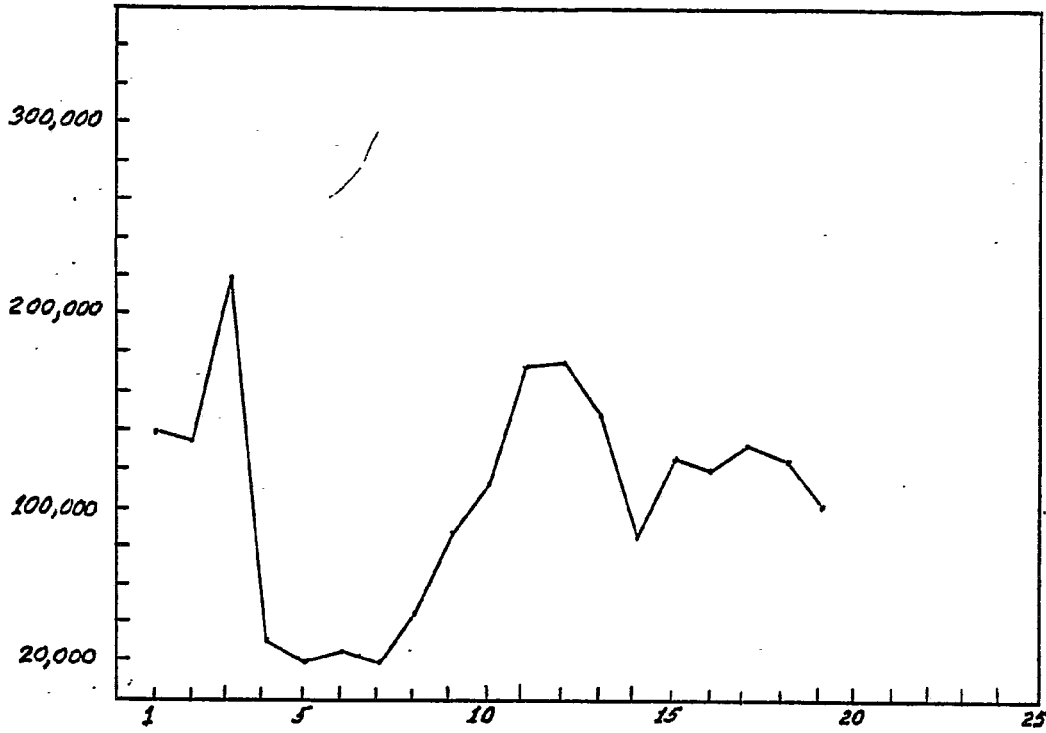


Fig. 2.



ESCALA VARIABLE
Madrid 20 JUN. 1977
F.A.
M

Fig. 4.

