

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

19 ES	11 NUMERO	10 A1
	21 461.937	
	22 FECHA DE PRESENTACION	
	29.8.77	

6 Nov. 1977
 Concedida el Real Decreto de 1977
 con los efectos que figura en la presente
 y en el Real Decreto de 1977
 de la Memoria adjunta.

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
718.694	30.8.76	EE.UU.
758.364	10.1.77	"
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	63 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	BOIL; GOIN	
54 TITULO DE LA INVENCION		
"UN RECIPIENTE HUECO Y ALARGADO JUNTO CON UN METODO PERFECCIONADO DE ANALISIS RADIOIMUNOLOGICO. INMUNOQUIMICO O ENZIMATICO"		
71 SOLICITANTE (S)		
MALLINCKRODT, INC.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
675 Brown Road, St. Louis, Missouri, Estados Unidos de América		
72 INVENTOR (ES)		
James Lee Brown, Wayne Han Ton Lin y James William Woods		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
D. ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ		(P.- 66.554)

IFG

POOR QUALITY

ANTECEDENTES DE LA INVENCIONCampo de la invención

Esta invención se refiere a recipientes tales como tubos de ensayo, adecuados para uso en determinaciones o procedimientos inmunoquímicos o enzimáticos, a su preparación, y a su uso en tales determinaciones o procedimientos. Son particularmente útiles en determinaciones de análisis radioinmunológico en fase sólida.

DESCRIPCION DE LA TECNICA ANTERIOR

Se conocen numerosos procedimientos inmunoquímicos en fase sólida. Típicamente, el reactivo biológicamente activo utilizado se hace insoluble antes de la reacción inmunológica por unión a un soporte insoluble, por ejemplo por adsorción física, por reticulación covalente, o por enlace covalente. En el caso del análisis radioinmunológico (RIA), un anticuerpo se hace insoluble antes de la reacción con un antígeno marcado y no marcado.

Se describen ejemplos de varios tubos de ensayo como soportes insolubles en las Patentes de los EE.UU. Nos. 3.721.528, 3.888.629, 3.768.979, 3.615.222, 3.865.552, 3.867.517 y 3.938.953. Estas patentes muestran tubos, incluyendo tubos de dos piezas, recubiertos con diversas sustancias biológicamente activas, tales como antígenos o anticuerpos. Se muestran partículas insolubles como soportes en las patentes de los EE.UU. nos. 3.551.555, 3.639.558 y 3.553.310. La patente 3.551.555 describe partículas polímeras recubiertas con una proteína inerte a la que se adsorbe una sustancia biológicamente activa. La patente 3.553.310 describe partículas polímeras recubiertas con una proteína inerte a la que se copula una sustancia biológicamente ac-

1 tiva usando un aldehído. La patente de los EE.UU. n.º
3.639.558 describe partículas polímeras a las que se copula
una proteína inerte y que tiene la sustancia biológicamente
activa copulada a la proteína. Se muestran un ejemplo de
5 un portaobjetos y una membrana microporosa en la patente de
los EE.UU. 3.666.421 y en la Alemana DT-2539-657. Se descri-
ben diversos polímeros y agentes de copulación en las pa-
tentes de los EE.UU. Nos. 3.555.143, 3.857.931, 3.646.346,
3.853.987, 3.708.572" y 3.714.345.

10 Los procedimientos de RIA en fase sólida emplean-
do un reactivo biológicamente activo unido a un soporte in-
soluble se desarrollaron para simplificar la separación de
antígeno libre de antígeno fijado a anticuerpo. Sin embar-
go, algunos de los corrientemente disponibles tienen una o
15 más de las desventajas siguientes, incluyendo un número ex-
cesivo de operaciones de manejo, baja reproductibilidad y/o
sensibilidad.

Por consiguiente, un procedimiento inmunoquímico
en fase sólida que proporcione una separación segura y rá-
20 pida y sea preciso, sensible y reproducible, sería un pro-
greso en la técnica.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

En uno de los aspectos de esta invención, se pro-
25 porciona un recipiente hueco y alargado adecuado para uso
en un procedimiento inmunoquímico o enzimático, que compren-
de:

(a) una parte reactiva inferior compuesta de un
material polímero, estando dicha parte cerrada por un extre-
30 mo, y teniendo, sobre al menos una parte de su superficie

15097

**POOR
QUALITY**

1 interior, un recubrimiento de una proteína inerte a la que
está unida una sustancia biológicamente activa, y

(b) una parte superior separable e inerte, conec-
tada con dicha parte inferior y en comunicación con ella.

5 Usando el recipiente antes citado en un procedi-
miento immunoquímico se aporta un procedimiento sencillo y
que se realiza fácilmente, que es preciso, sensible y re-
producibile. Las partes separables permiten una facilidad y
uniformidad de fabricación, la provisión de un recubrimien-
10 to sustancialmente uniforme de proteína inerte sobre una
superficie continua para procedimientos immunoquímicos da-
dos; y por consiguiente, a una determinación o ensayo más
fiable y más exacto. El recubrimiento de proteína inerte
hace posible emplear eficazmente la sustancia biológicamen-
15 te activa. La proteína inerte estabiliza la sustancia bio-
lógicamente activa y aumenta su actividad. También propor-
ciona una superficie con características constantes.

Cuando la sustancia biológicamente activa está
unida por enlace covalente, aumenta la cantidad que puede
20 unirse. El enlace covalente de la sustancia biológicamente
activa al recubrimiento de proteína inerte es más fácil de
controlar que las demás formas de unión. Además, con el en-
lace covalente se reduce el sangrado o la lixiviación de
la sustancia biológicamente activa hacia la mezcla de reac-
25 ción, aumentando así la precisión y la reproductibilidad
del procedimiento immunoquímico.

Otro aspecto de esta invención se refiere a un
recipiente alargado y hueco que comprende

(a) una parte reactiva inferior compuesta de un
30 material polímero, estando dicha parte cerrada por un extre

1 mo, y teniendo al menos una parte, tanto de su superficie
interior como de su superficie exterior, recubierta con
una proteína inerte a la que está unida una sustancia bioló-
gicamente activa, y

5 (b) una parte superior separable e inerte, conec-
tada con dicha parte inferior y en comunicación con ella.

Otro aspecto se refiere a un método de tratar
los anteriores recipientes, particularmente en gran escala.

Otro aspecto se refiere al uso de los anteriores
10 recipientes en procedimientos enzimáticos e inmunológicos,
particularmente en procedimientos de RIA.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCIÓN

15 Como se ha dicho, la parte reactiva inferior del
recipiente se compone de un material o materiales políme-
ros. Los materiales polímeros adecuados que pueden usarse
para preparar la parte reactiva inferior son muy conocidos
para los expertos en la técnica. Tales materiales polímeros
son, típicamente, sustancialmente insolubles en agua, tie-
20 nen una baja afinidad para la sustancia biológicamente ac-
tiva unida, y son capaces de ser moldeados. Los ejemplos de
tales materiales polímeros incluyen los polímeros orgánicos
tales como polímeros de hidrocarburos, es decir poliestire-
no, polietileno, polipropileno, polibutileno, poliestireno
25 diazotado, caucho butílico y otros cauchos sintéticos. Otros
polímeros adecuados son poliésteres, poliamidas, celulosa,
derivados de celulosa, acrilatos, metacrilatos, y polímeros
vinílicos, tales como poli(cloruro de vinilo) y poli(cloru-
ro de vinilideno). Otros polímeros satisfactorios incluyen
30 los copolímeros, tales como copolímeros de injerto sustitui-

15097

**POOR
QUALITY**

1 dos de poliestireno y politetrafluoroetileno. Pueden usar-
se también vidrio, típicamente el que se emplea en tubos de
ensayo o en los aparatos de laboratorio. Por su disponibi-
5 lidad comercial y facilidad de uso, son polímeros especial-
mente útiles los copolímeros de etileno y ácido acrílico.
Típicamente, tales copolímeros contienen de alrededor de
80 a 97 moles por ciento de etileno, y de alrededor de 3 a
20 moles por ciento de ácido acrílico. Otros polímeros pre-
feribles incluyen los copolímeros de ácido acrílico y acrí-
10 lamida; metacrilato de metilo y acrilamida; metacrilato de
metilo y metacrilamida; y metacrilato de metilo y acrilami-
da.

Preferiblemente, la parte reactiva inferior está
en la forma de un tubo convencional usado en procedimientos
15 immunoquímicos. La longitud de la parte reactiva inferior
puede ser cualquier tamaño conveniente, y en general es de
longitud suficiente para proporcionar la cantidad necesaria
de sustancia biológicamente activa para el procedimiento o
ensayo immunoquímico implicado. En general, la longitud es
20 de alrededor de 10 mm a 50 mm, y preferiblemente de alrede-
dor de 15 mm a 25 mm, y óptimamente de alrededor de 20 mm,
y el diámetro es de alrededor de 5 mm a 20 mm, preferible-
mente de 10 a 20 mm, y óptimamente de alrededor de 12 mm.
Una parte reactiva inferior que tiene alrededor de 20 mm de
25 longitud y un diámetro de alrededor de 12 mm tendrá una ca-
pacidad de alrededor de 1,2 ml. Naturalmente, la capacidad
depende de la longitud y el diámetro de la parte inferior.
El uso de la parte reactiva inferior permite una facilidad
de aplicación. Además, se requieren unos ingredientes y un
30 equipo menos activo. Además, la parte reactiva inferior pue

1 de hacerse con el polímero más ventajoso para el recubri-
miento y la unión de una sustancia biológicamente activa,
y la parte superior inerte puede estar formada ventajosamente
5 de polipropileno o polietileno, que proporcionan ambos
rigidez, son fáciles de transformar y manejar y son relati-
vamente baratos.

A la parte inferior reactiva, según esta inven-
ción, se la une una proteína inerte. La expresión proteína
inerte significa una proteína que no toma parte en la reac-
10 ción inmunoquímica y no perjudica a la sustancia biológica.
Las proteínas que pueden usarse son muy conocidas por los
expertos en la técnica. Incluyen cualquier material proteí-
nico, tal como seroalbúminas o globulinas obtenidas de di-
versas especies animales, o pueden ser otros materiales uni-
15 formes.

Se prefieren particularmente la gammaglobulina
bovina y la gelatina, que pueden adquirirse fácilmente. Es
deseable que el material proteínico empleado sea suficien-
temente homogéneo para que usándolo pueda obtenerse una su-
20 perficie esencialmente continua. Tal superficie puede obte-
nerse fácilmente con las proteínas anteriores.

Puede unirse a la proteína inerte una amplia gama
de sustancias biológicamente activas. Tales sustancias in-
cluyen antígenos y anticuerpos que tienen propiedades inmu-
25 nológicas y enzimas que tienen propiedades enzimáticas.

Los antígenos pueden definirse como sustancias
que estimulan la formación de un anticuerpo en un animal,
y que pueden reaccionar de modo observable con el anticuer-
po. Los antígenos tienen generalmente un peso molecular al-
30 to, de 10.000 ó mayor. Un hapteno es una sustancia de bajo

1 peso molecular que por sí misma no puede estimular una res-
puesta de un anticuerpo, pero que cuando está copulado quí-
micamente a una sustancia de alto peso molecular, por ej.
una proteína, puede estimular una respuesta de un anticuer-
5 po, y el hapteno puede reaccionar con el anticuerpo resul-
tante. Hay una descripción detallada de antígenos en "Prin-
ciples of Immunology", Ed. Rose, Milgram y van Oss, MacMi-
llan Publishing Co., Nueva York, 1973.

En respuesta a una inyección de antígenos, el
10 cuerpo de un animal produce anticuerpos específicos que
reaccionan con los antígenos y los neutralizan. Los anti-
cuerpos están clasificados como proteínas con la solubili-
dad de las globulinas. Su peso molecular está clasificado
principalmente en dos grupos, de alrededor de 160.000, de-
15 nominadas globulinas normales, y 1.000.000, denominadas ma-
croglobulinas. El tipo de bajo peso molecular predomina en
la mayoría de las especies animales. Se produce un anticuer-
po pesado en el caballo, la vaca y el cerdo inmunizados
con neumococos, y en los conejos inmunizados con glóbulos
20 rojos de oveja. Los pesos moleculares de los anticuerpos
no difieren significativamente de los pesos moleculares de
las globulinas de los sueros normales de las diversas espe-
cies. Son de importancia particular las globulinas que constan
de una serie continua de proteínas de diferentes propie-
25 dades físicas y químicas y de actividades biológicas que se
solapan. Muestran amplias variaciones en movilidad electro-
forética, precipitan por salificación en un intervalo consi-
derable de concentraciones de electrolito, producen muchas
fracciones por el método de precipitación con alcohol, y
30 tienen constantes de sedimentación de desde 7S a 20S (uni-

1 -dades Svedberg).

Los anticuerpos típicos que pueden unirse a la proteína inerte incluyen los anticuerpos contra los haptenos digoxina, triyodotironina (T3), tiroxina (T4), TSH, 5 angiotensina, gonadotropina coriónica humana (HCG) e insulina; los diversos esteroides biológicamente activos; los ácidos biliares; otras hormonas de polipéptidos; las enzimas e isoenzimas; y las sustancias farmacológicamente activas tales como las drogas de abuso así como las usadas para 10 terapéuticas, y otras.

Las enzimas que pueden unirse a la proteína inerte incluyen la diastasa, oxidasa de glucosa, ureasa, maltasa, amilasa, peroxidasa, y otras enzimas y coenzimas.

Según el procedimiento de esta invención, las 15 partes reactivas inferiores de los recipientes se preparan por medio de un procedimiento que comprende (a) recubrir por adsorción la superficie de una parte reactiva inferior con una proteína inerte, en condiciones de adsorción, (b) unir una sustancia biológicamente activa al recubrimiento 20 de proteína inerte de la parte reactiva inferior de (a), en condiciones de unión, (c) tratar la parte reactiva inferior de (b), que tiene la sustancia biológicamente activa unida al recubrimiento de proteína inerte, con un agente estabilizante para estabilizar contra la desnaturalización 25 a tal sustancia biológicamente activa, y (d) secar la parte reactiva (c) en condiciones de secado que no desnaturalicen sustancialmente la sustancia biológicamente activa. Los recipientes de esta invención se preparan después uniendo la parte inerte superior a la parte reactiva inferior.

30 La cantidad de proteína inerte utilizada que da

1 resultados óptimos depende de la naturaleza de la proteína
inerte, de la parte reactiva, y de las sustancias biológi-
cas. Esta cantidad puede determinarse fácilmente por los
5 expertos en la técnica. Típicamente, sólo se une a la su-
perficie una película delgada, por ej. al menos una capa
de moléculas de espesor, de proteína. En general, ésta es
una cantidad suficiente para efectuar un recubrimiento uni-
forme al que puede unirse la sustancia biológicamente acti-
va.

10 La proteína inerte se une fácilmente a la super-
ficie para formar un recubrimiento por pulverización, imbi-
bición, o, preferiblemente, sumergiendo la parte reactiva
inferior en una disolución acuosa de proteína inerte, pre-
feriblemente una disolución acuosa tamponadora, en condi-
15 ciones de recubrimiento. De este modo la proteína se adsor-
be a la superficie de la parte inferior reactiva. Es venta-
joso emplear disoluciones acuosas tamponadoras de fosfatos.
Estos tampones se describen en U.S.P. (Farmacopea de los
EE.UU.) XIX y se preparan en general empleando fosfato áci-
20 do dipotásico y fosfato diácido de potasio. Las cantidades
apropiadas se disuelven en agua para producir el pH desea-
do, y el pH se ajusta, si es necesario, con KOH ó HCl. Si
se desea, puede añadirse a la disolución tamponadora un
agente bacteriostático para inhibir el desarrollo de micro-
25 organismos, tales como azida de sodio o timerosal.

La proteína inerte se recubre en condiciones de
adsorción que no causen la desnaturalización de la proteí-
na. Las condiciones específicas de pH y temperatura depen-
den de la proteína inerte particular. Las condiciones de
30 adsorción incluyen un pH convencional, por ej. de alrededor

1 de 3 a 10, y temperaturas convencionales, por ej. de alre-
dedor de 20°C a 30°C. Aunque pueden emplearse temperaturas
de aplicación superiores e inferiores, por ejemplo de sólo
4°C y de hasta 50°C, no hay ninguna ventaja importante. De
5 hecho, a temperaturas de más de 50°C, la proteína se desna-
turaliza en general. A temperaturas inferiores a 4°C, la
proteína es difícil de aplicar. Por ejemplo, la gammaglobu-
lina bovina se aplica como recubrimiento generalmente a un
pH de 5 a 7, y óptimamente 6,4, a temperatura ambiente.

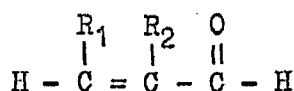
10 Para facilitar la unión de la proteína inerte,
la superficie de la parte reactiva inferior puede tratarse,
antes de la unión, con diversos materiales que mejoren la
adsorción de la proteína inerte. Tales materiales incluyen
disolventes, tensioactivos, ácidos o bases.

15 Se emplean tensioactivos, ventajosamente dodecil-
sulfato de sodio, como detergente para limpiar la superfi-
cie y hacerla mojable. Si los polímeros contienen grupos
carboxilo sobre la superficie, frecuentemente es deseable
tratarlos con una base formadora de sal, por ej. KOH, para
20 convertirlos en la forma de sal, dándoles una carga negati-
va que aporta una mejor atracción eléctrica que mejora aún
más la adsorción. La base ayuda también a limpiar la super-
ficie. En otro aspecto, es ventajoso hacer que la distribu-
ción de cargas sobre la superficie sea aproximadamente
25 igual a la de la proteína inerte a aplicar. Esto se consi-
gue lavando la superficie con una disolución acuosa tampo-
nadora, que tiene aproximadamente el mismo pH que la diso-
lución de recubrimiento que contiene la proteína inerte, an-
tes del recubrimiento.

30 La sustancia biológicamente activa puede unirse

1 por cualquier medio adecuado. Tales medios adecuados, cono-
cidos en la técnica incluyen la adsorción, el enlace cova-
lente, el enlace iónico y la retención. Se prefiere unir
la sustancia biológicamente activa por enlace covalente,
5 porque es más fácil de controlar la reacción de copulación
y el producto es más estable.

Se describen métodos para unir químicamente, es
decir de modo covalente, las sustancias biológicamente ac-
tivas a la proteína inerte, en las patentes de los EE.UU.
10 Nos. 3.553.310 y 3.639.558, todas las cuales se incorporan
aquí como referencia. Un método preferido de hacer un enla-
ce covalente de la sustancia biológicamente activa a la
proteína inerte es tratar primero la proteína con un agente
de copulación de aldehído, y aplicar después la sustancia
15 biológicamente activa en condiciones que permitan al alde-
hído unirse de modo covalente tanto a la proteína inerte
como a la sustancia biológicamente activa. Los agentes de
copulación de aldehído adecuados son los que tienen o bien
insaturación α , β (etilénica) o bien una pluralidad de
20 grupos aldehído, o ambas cosas. Por mayor facilidad y con-
veniencia se prefiere usar un aldehído seleccionado del
grupo de un aldehído α , β insaturado, un dialdehído o mez-
clas de los mismos, para formar productos de reacción de
aldehído con el recubrimiento de proteína inerte. Los alde-
25 hídos α , β insaturados pueden ser un compuesto que tiene
una fórmula del tipo



30 donde cualquiera de los R_1 , o R_2 puede ser hidrógeno o un

1 grupo metilo. Son representativos de este tipo de aldehido la acroleína, metaacroleína y el 2-butenal. Pueden emplearse dialdehidos tales como glutaraldehido, propanodial y butanodial.

5 Cuando uno de estos aldehidos se pone en contacto con la superficie de la proteína inerte, la proteína se estabiliza y se polimeriza por reticulación, y se fijan restos activos de aldehido a las superficies. Se cree que estos restos son grupos carbonilo, y como tales son altamente reactivos para los grupos amínicos de la sustancia biológicamente activa, ya que forman enlaces covalentes entre las partículas de proteína y las sustancias biológicamente activas.

15 Como alternativa a los aldehidos pueden usarse otros materiales de copulación, tales como compuestos que tengan dos o más de los siguientes grupos reactivos: azo, ácido sulfónico, grupos fluoro activados por grupos nitro, azida, imina y grupos cloro reactivos conectados a un anillo que tiene una estructura resonante apropiada. Estos grupos reactivos son capaces de reaccionar con los grupos amino primarios, sulfhidrilo, carboxílico, hidroxilo y fenólicos en las sustancias que constituyen la proteína inerte, así como las sustancias biológicas que hay que copular a las mismas.

25 Una lista representativa de tales agentes de copulación comprende el ácido bis-diazobenzadinsulfónico, tetraazo-p-fenilendiamina, difluorodinitrobenceno, difluorodinitrofenilsulfona, una carbodiimida, toluendiisocianato, cloruro cianúrico, diclorotriazina, perclorato de N-terc-butil-5-metil-isoxazolio. Las carbodiimidias que pueden emplear

1 se son la N,N-diciclohexilcarbodiimida, clorhidrato de
1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)-carbodiimida, y metil-p-
-toluensulfonato de 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4)-etil-
-carbodiimida.

5 Alternativamente, las sustancias biológicamente
activas antes citadas pueden unirse por adsorción, según el
procedimiento descrito en la patente de los EE.UU. n.º
3.551.555.

10 La cantidad de agente de copulación utilizado en
el procedimiento preferido de esta invención dependerá de
la proteína inerte particular y de la sustancia biológica-
mente activa a copular. Esta cantidad puede determinarse
fácilmente por los expertos en la técnica, pero típicamente
será una cantidad suficiente para reticular la proteína
15 inerte y proporcionar puntos suficientes para copular a la
proteína inerte suficiente sustancia biológicamente activa
para efectuar el procedimiento inmunológico o enzimático
deseado. En el caso de los aldehidos, esta cantidad es ge-
neralmente de desde 0,1 a alrededor de 10% (peso/vol.), y
20 preferiblemente de alrededor de 1 a alrededor de 2% (peso/
vol.).

Típicamente, el agente de copulación se aplica
en una disolución tamponadora acuosa, lo más ventajosamente
un tampón de fosfato, que puede contener otros ingredientes
25 tales como antioxidantes, y agentes bacteriostáticos. El
agente de copulación puede aplicarse a cualquier pH conve-
niente, por ejemplo de alrededor de 3 a alrededor de 10. El
agente de copulación puede aplicarse convenientemente a
temperatura ambiente. Pueden emplearse temperaturas más ba-
30 jas, por ejemplo de sólo 4°C, pero las temperaturas infe-

1 riores a 4°C no aportan ninguna ventaja importante. Pueden
emplearse igualmente temperaturas superiores, por ejemplo
de hasta 50°C, pero tales temperaturas no dan ninguna ven-
taja importante. En el caso de los aldehidos, el pH es ge-
5 neralmente de alrededor de 6 a 8, y la temperatura es gene-
ralmente de alrededor de 20°C a 30°C.

Para facilitar la fijación del agente de copula-
ción a la proteína inerte, es ventajoso lavar la proteína
con el mismo tamponador sin el agente de copulación, antes
10 del tratamiento con el tamponador que contiene el agente
de copulación. Como la máxima estabilidad del agente de co-
pulación es al pH de la disolución tamponadora, este lava-
do proporciona el ambiente más adecuado para la estabili-
dad del agente de copulación.

15 La cantidad de sustancia biológicamente activa
empleada en la práctica de esta invención depende de la na-
turaleza de la proteína inerte y de la sustancia biológica-
mente activa particular. Tales cantidades pueden determinarse
se fácilmente por los expertos en la técnica. Típicamente,
20 será una cantidad suficiente para efectuar la determinación
o el procedimiento en el que se emplea. Por ejemplo, en el
caso de un cierto antisuero de digoxina, la dilución (es de
cir partes de antisuero que contiene anticuerpo/partes de
disolución de tratamiento) es de alrededor de 1/300.000 a
25 alrededor de 1/360.000, y preferiblemente 1/325.000 a
1/335.000.

La sustancia biológicamente activa se aplica ven-
tajosamente en una disolución acuosa, preferiblemente una
disolución acuosa tamponadora de fosfato. Se aplica en con-
30 diciones de unión que no desnaturalicen la proteína, que

1 incluyen la aplicación a temperatura ambiente, pero pueden
emplearse temperaturas superiores o inferiores, a cualquier
pH conveniente en el intervalo de desde 3 a alrededor de 10.
Pueden emplearse convenientemente temperaturas de sólo 4°C
5 o menores, y de hasta 50°C. Sin embargo, no se obtiene nin-
guna ventaja importante empleando temperaturas por encima
de 50°C. Generalmente se emplea un pH de 6 a 7 en el caso
de anticuerpos para la digoxina, triyodotironina y tirexina.

10 En otro aspecto, la presente invención comprende
el uso de un agente protector para proteger más la sustan-
cia biológicamente activa contra la desnaturalización duran-
te la aplicación, y generalmente se emplea en una cantidad
eficaz para dar tal protección, disminuyendo los factores
de desnaturalización. Por ejemplo, el agente protector está
15 presente en cantidades mucho mayores que la sustancia bioló-
gicamente activa, y protege desnaturalizándose primero a
medida que se aplica la sustancia biológicamente activa.
Es particularmente ventajoso usar estos agentes en las ope-
raciones de fabricación a gran escala. Estos agentes inclu-
20 yen la albúmina de suero bovino u otras proteínas protecto-
ras que no perjudiquen a la sustancia biológica activa ni
al recubrimiento de proteína adsorbida. En el caso de la
albúmina de suero bovino, se usa en general en una cantidad
de desde alrededor de 0,05% (peso/vol.) a alrededor de 1%
25 (peso/vol.), preferiblemente de 0,1 a alrededor de 0,2%
(peso/vol.).

30 Para facilitar la unión de la sustancia biológica-
mente activa, antes de aplicarla a la parte reactiva, ésta
se lava, ventajosamente, con el mismo tamponador en que es-
té la sustancia biológicamente activa.

1 Una vez aplicada la sustancia biológicamente activa, es preferible eliminar inmediatamente cualquier exceso de sustancia biológicamente activa que no haya reaccionado. En el caso de los anticuerpos ésto se efectúa ventajosamente
5 te tratándola con una disolución tamponadora de aminoácido que tenga un pH de generalmente alrededor de 1 a 3. Se prefiere un tampón de cloruro de glicina y sodio. Después de este tratamiento, las partes reactivas se tratan preferiblemente con una disolución tamponadora que tenga un pH
10 en el intervalo de 6 a 8, para elevar el pH hasta un valor casi neutro.

A continuación, la parte reactiva inferior se trata con un agente estabilizante para estabilizar la actividad de la sustancia biológicamente activa copulada frente
15 a la desnaturalización. Tal agente estabilizante es un poli(alcohol vinílico) que tiene una viscosidad de 4-6 centipoises (disolución al 1% en peso/vol.) a 20°C. Generalmente se aplica en una proporción estabilizante eficaz, por ejemplo de 2% (en peso/vol.). Usualmente se aplica en una
20 disolución acuosa tamponadora, preferiblemente un tampón de fosfato, a temperatura ambiente. En general, el pH de esta disolución tamponadora depende del pH al que es más estable la sustancia biológicamente activa. Después del tratamiento con el agente estabilizante, la parte reactiva inferior se
25 escurre y se seca en condiciones de secado que no causen la desnaturalización de la sustancia biológicamente activa. Es ventajoso emplear secado por vacío. Puede emplearse cualquier secador comercial, usando temperaturas de secado de generalmente 10°C a 45°C, y preferiblemente 25°C a 35°C.

30 Entre una y otra de las operaciones antes citadas,

1 es preferible usar varios lavados con agua, para asegurar-
se de que no se arrastra ninguna contaminación. En general,
las disoluciones de tratamiento se agitan a una velocidad,
durante su aplicación, que no perjudique a la proteína inerte,
5 al recubrimiento de proteína inerte, a la sustancia bio-
lógicamente activa, o al recubrimiento de proteína inerte
al que está unida la sustancia biológicamente activa, ni
cause una formación excesiva de burbujas, pero sí suficien-
te para asegurar un completo mezclado y llevar a cabo el
10 tratamiento apropiado. Por ejemplo, en el caso de la disolu-
ción de tratamiento de proteína inerte, la velocidad de agi-
tación puede determinarse fácilmente, agitando un número de
lotes a varias velocidades y determinando después las velo-
cidades óptimas. Puede usarse el mismo procedimiento para
15 determinar la velocidad para las disoluciones de tratamien-
to que contienen el aldehído, la sustancia biológicamente
activa, y para las diversas disoluciones tamponadoras.

En general, se usan alrededor de 6 partes de diso-
lución de tratamiento por cada parte de la parte reactiva
20 inferior. Pueden usarse, más o menos, alrededor de 2 a 12
partes, por ejemplo, por parte de parte reactiva inferior.

La parte superior inerte separable según esta in-
vención puede ser cualquiera de los polímeros antes citados,
incluso vidrio. Inerte significa que la parte no influirá
25 perjudicialmente en las sustancias biológicas que toman par-
te en el ensayo inmunoquímico. Los polímeros usados típicamente,
por conveniencia y por su bajo coste, incluyen el po-
lipropileno y el polietileno. Además, aportan rigidez. Como
se advertirá, el objeto de la parte superior inerte es pro-
30 porcionar una capacidad adecuada para efectuar el procedi-

1 miento immunoquímico o enzimático. Usualmente, esta parte
consta de una porción o porciones que están abiertas por
ambos extremos, y que están unidas a la parte reactiva in-
ferior. Puede unirse por cualquier medio adecuado que pro-
5 porcione un recipiente sin fugas (por ej. hermético para el
agua). Por ejemplo, la parte inferior puede estar diseñada
de modo que ajuste a presión en la parte superior. La parte
superior puede unirse también por termosellado u otro medio
adecuado conocido por los expertos en la técnica. El tamaño
10 de la parte superior inerte puede variar según los procedi-
mientos immunoquímicos o enzimáticos empleados, y ésto po-
drá averiguarse fácilmente por los expertos en la técnica.
En general, la longitud es desde alrededor de 50 mm a alre-
dedor de 100 mm, preferiblemente de alrededor de 55 mm a
15 alrededor de 80 mm, y óptimamente 65 mm. El diámetro es ge-
neralmente aproximadamente el mismo que la parte reactiva
inferior.

Se hará ahora referencia al dibujo, que ilustra
una realización preferida de esta invención. La Figura 1
20 muestra un dispositivo de esta invención en forma de tubo.
La Figura 2 muestra la parte superior inerte. La Figura 3
muestra la parte inferior reactiva. La parte reactiva infe-
rior 1 tiene un recubrimiento de proteína inerte al que se
une la sustancia biológica sobre su superficie interior 3
25 y su superficie superior 4. La Parte superior separable e
inerte 2 está unida a la Parte inferior reactiva 1.

En una realización preferida de esta invención,
las partes inferiores reactivas de los recipientes de esta
invención tienen, tanto sobre la superficie interior como
30 sobre la superior de la parte reactiva un recubrimiento de

1 - proteína inerte, a la que está unida por enlace covalente
la sustancia biológicamente activa.

Otro aspecto de esta invención es el uso de estos
sistemas de separación en procedimientos o determinaciones
5 inmunquímicas, para determinar concentraciones de antígeno
o hapteno, de modo particularmente ventajoso en determina-
ciones o ensayos de RIA. Estos procedimientos de RIA y las
técnicas para efectuarlos son muy conocidos por los exper-
tos en la técnica. Se describirán con más detalle en los
10 ejemplos que siguen.

EJEMPLO 1

Se prepararon, como sigue, 1.300 partes inferio-
res reactivas que tenían la forma mostrada en la Figura 3,
15 con una capacidad de 1,1 ml, y compuestas de un polímero de
polietileno y ácido acrílico (92 moles por ciento de polie-
tileno y 8 moles por ciento de ácido acrílico).

(1) Las 1.300 partes inferiores sin tratar se su-
mergieron en un recipiente de acero inoxidable o polietile-
no que contenía 7800 ml de disolución acuosa al 0,5% de do-
20 decilsulfato de sodio (SDS) y se agitaron durante 30 minu-
tos a temperatura ambiente. (2) Se retiró la disolución de
SDS, se sustituyó por 7800 ml de agua, y las partes se la-
varon después durante 5 minutos. Este procedimiento de la-
vado se repitió dos veces. (3) Se quitó el agua, se susti-
25 tuyó por 7800 ml de una disolución acuosa de hidróxido de
potasio 0,2 N, y las partes se agitaron 30 minutos en esta
disolución. (4) Después se retiró la disolución de hidró-
xido de potasio, se sustituyó por agua, y las partes se la-
30 varon durante 5 minutos. Este procedimiento de lavado se

1 repitió hasta que el pH de la disolución de lavado final
era de 7,0. (5) Se retiró el agua, se sustituyó por una
disolución acuosa de fosfato 0,1 M (pH 6,4) que contenía
0,1% de gammaglobulina bovina y 0,1% de azida de sodio, y
5 las partes se agitaron durante 30 minutos en esta disolu-
ción. (6) La disolución de gammaglobulina se retiró, se
sustituyó por agua, y se lavaron las partes reactivas in-
feriores durante 5 minutos. Este procedimiento de lavado
se repitió tres veces. (7) El agua se sustituyó por 7800
10 ml de una disolución tamponadora de fosfato (0,1 M; pH 7,4)
que contenía 2% de glutaraldehído, y las partes inferiores
se agitaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en
esta disolución. (8) Se retiró la disolución de glutaral-
dehído, se sustituyó por 7800 ml de agua, y las partes se
15 lavaron durante 10 minutos. (9) Se sustituyó el agua por
una disolución acuosa tamponadora de fosfato (0,01 M; pH
7,0) que contenía anticuerpos de digoxina (de cabra) en
una dilución de 1:160.000, suero normal de cabra con una
dilución de 1:32.000, 0,1% de albúmina de suero normal y
20 0,01% de azida de sodio, y las partes inferiores se agita-
ron durante media hora en esta disolución a temperatura
ambiente. (10) La disolución de tratamiento se sustituyó
por 7800 ml de agua y las partes reactivas inferiores se
lavarón durante 10 minutos. Este procedimiento de lavado
25 se repitió dos veces. (11) El agua se sustituyó por 7800
ml de una disolución acuosa tamponadora de cloruro de gli-
cina y sodio (0,1 M; pH 2,3) y las partes se lavaron 30 mi-
nutos, a temperatura ambiente. (12) La disolución tampona-
dora de glicina se separó y se sustituyó por 7800 ml de di-
30 solución tamponadora de fosfato 0,1 M de pH 7,4, y las par-

1 -tes se lavaron durante 10 minutos. Este procedimiento de lavado se repitió una vez. (13) Se retiró el tampón de fosfato, se substituyó por 7800 ml de una disolución acuosa salina tamponada con fosfato (0,01 M; pH 7,4, 0,9% de NaCl) y las partes inferiores se agitaron en esta disolución durante 30 minutos a temperatura ambiente. (14) La disolución salina tamponada con fosfato se retiró y se substituyó por 7800 ml de tampón de fosfato 0,01 M de pH 7,4 que contenía 2% de poli(alcohol vinílico) y 0,01% de azida de sodio, y las piezas se agitaron durante 30 minutos. (15) Las partes reactivas inferiores se secaron en vacío durante alrededor de dos horas. (16) A las partes reactivas inferiores se les unieron partes inertes superiores uniéndolas a presión, para dar así un tubo de ensayo convencional adecuado para uso en procedimientos de RIA en fase sólida. La parte inerte superior se componía de polipropileno y tenía una longitud de alrededor de 8,25 centímetros.

EJEMPLO 2

20 Procedimiento de RIA (análisis radioinmunológico)

En un soporte de tubos de ensayo convencionales se colocan 12 tubos recubiertos de anticuerpos de digoxina preparados según esta invención. A cada tubo se le añaden con pipeta 1 ml de mezcla de reacción de digoxina que contiene digoxina I-125 en disolución tamponadora de fosfato (fosfato 0,01 M, pH 7,4, 0,9% de cloruro de sodio). A cada tubo se le añaden con pipeta 100 microlitros de suero patrón en dilución apropiada de digoxina, es decir 0 nanogramos (ng) por ml en los tubos 1 y 2; 0,4 ng por ml en los tubos 3 y 4; 1 ng por ml en los tubos 5 y 6; 2 ng por ml en

1 los tubos 7 y 8; 3 ng por ml en los tubos 9 y 10, y 5 ng
 por ml en los tubos 11 y 12. Se agita suavemente el soporte
 de los tubos durante 5 a 10 segundos y después se incu-
 ban en un baño de agua durante alrededor de una hora a al-
 5 rededor de 37°C. Se retira el soporte y después se decanta
 el contenido de todos los tubos, cuidadosamente. Se dosifi-
 can dos ml de agua destilada en cada uno de los tubos y se
 decanta. Los tubos se someten a recuento de impulsos en un
 contador gamma durante un minuto. Los cálculos se hacen co-
 10 mo sigue:

1. Se calcula el recuento neto por minuto de to-
 dos los patrones restando el recuento medio de fondo del
 instrumento.

2. Se expresa el recuento correcto para cada jue-
 15 go de patrones como tanto por ciento del promedio (0 ng por
 ml) del recuento patrón (% B^{*}/BO^{**})

$$\% B/BO = \frac{\text{recuento de impulsos corregido por minuto, del patrón}}{\text{recuento corregido por minuto (de 0 ng por ml)}} \times 100$$

20 * B = tanto por ciento fijado en todos los demás
 tubos

** BO = tanto por ciento fijado en el patrón de 0
 ng por ml.

3. Usando papel de gráficas semilogarítmico, se
 25 representa el % B/BO para cada concentración patrón en fun-
 ción de la concentración de digoxina en ng por ml.

Procedimiento real

Se obtuvieron los resultados siguientes siguiendo
 30 el procedimiento anterior:

1	Muestra (ng/ml)	Recuento posterior (neto) (impulsos por min.)	B/B (%)
	0	6202	100%
	0	5810	
		6006 (promedio)	
5	0,4	4886	81,4
	0,4	4920	81,9
	1,0	4032	67,1
	1,0	3960	65,9
	2,0	2232	37,2
10	2,0	2470	41,1
	3,0	1712	28,5
	3,0	1725	28,7
	5,0	1247	20,8
	5,0	1023	17,0

15 Una gráfica de los anteriores resultados indican la sensibilidad y reproductibilidad del ensayo.

EJEMPLO 3

Se siguió el procedimiento dado en el Ejemplo 1 para recubrir partes reactivas inferiores con anticuerpo para triyodotironina (T_3), salvo en que la dilución de la disolución de recubrimiento de anticuerpo en la operación (9) era de 1:10.000, y se omitió el suero normal de cabra. Se prepararon lotes de varios cientos de partes reactivas inferiores, ajustando el volumen de disolución de tratamiento sobre una base de 6,0 ml por parte. Estas partes se usaron después para determinar la absorción de triyodotironina en muestras de suero.

EJEMPLO 4

30 Se emplean las disoluciones siguientes para tra-

1 -tar los recipientes de esta invención que se describen más adelante.

Reactivos para hacer un litro de disolución

5 1. Tampón de fosfato, 0,1 M, pH 6,4 (I)

a) Se añaden a agua, con agitación, 9,96 g de fosfato diácido de potasio.

b) A la disolución de 1a) se le añaden 4,66 g de fosfato ácido dipotásico.

10 c) Se diluye hasta 900 ml con agua y se añade 1,0 g de azida de sodio.

Se mide el pH con un medidor de pH. Si el pH está fuera del intervalo de 6,3-6,5, se ajusta con disoluciones de KOH ó HCl, según se requiera.

15 d) Se diluye hasta un litro.

2. Tampón de fosfato, 0,1 M, pH 7,4 (II)

a) Se añaden a agua, con agitación, 2,66 g de fosfato diácido de potasio.

20 b) Se añaden, con agitación, 14,00 g de fosfato ácido dipotásico a la disolución 2a).

c) Se diluye la disolución 2b) hasta 900 ml y se mide el pH con un medidor de pH. Si el pH no está entre 7,3 y 7,5, se ajusta con disoluciones de KOH ó HCl según se requiera.

25 d) Se diluye la disolución 2c) hasta un litro.

3. Tampón de fosfato, 0,01 M, pH 7,0, 0,01% de azida de sodio (III).

30 a) Se añaden a agua, con agitación, 0,533 g de fosfato diácido de potasio.

- 1 b) Se añade a la disolución 3a), con agitación, 1,056 g de fosfato ácido dipotásico.
- 5 c) Se diluye la disolución 3b) hasta 900 ml con agua y se añaden 100 mg de azida de sodio. Se mide el pH con un medidor de pH. Se ajusta, si es necesario, a pH entre 7,0-7,1 con disolución de KOH ó HCl.
- 10 d) Se diluye la disolución 3c) hasta un litro.
4. Tampón de glicina, 0,1 M, pH 2,3 (I).
- 15 a) Se añaden, con agitación, 7,5 g de glicina y 5,85 g de cloruro de sodio a 600 ml de agua.
- b) A la disolución 4a) se le añaden 5,3 ml de HCl concentrado y se diluye hasta 900 ml. Si el pH está fuera del intervalo 2,3-2,4, se ajusta con disoluciones de KOH ó HCl según se precise. Se diluye con agua hasta 1,0 litro.

20 Preparación de recipientes usando las disoluciones anteriores.

25 Se prepararon, como sigue, 100 partes reactivas inferiores que tenían la forma mostrada en la Figura 3, con una capacidad de 1,1 ml, y compuestas de polímero de polietileno y ácido acrílico (92 moles por ciento de polietileno y 8 moles por ciento de ácido acrílico).

30 (1) Las 100 partes inferiores sin tratar se sumergieron en un recipiente de acero inoxidable o polietileno que contenía 600 ml de disolución acuosa al 0,5% de dodecilsulfato de sodio (SDS), y se agitaron durante 60 minutos

1 a temperatura ambiente. (2) Se retiró la disolución de
SDS, se substituyó por 600 ml de agua, y las partes se la-
varon durante 5 minutos. Este procedimiento de lavado se
repetió dos veces. (3) Se retiró el agua, se substituyó
5 por 600 ml de una disolución acuosa de hidróxido de pota-
sio 0,2 N, y las partes se agitaron durante 30 minutos en
esta disolución. (4) Se quitó después la disolución de hi-
dróxido de potasio, se substituyó por agua, y las partes se
lavaron durante 5 minutos. Este procedimiento de lavado se
10 repetió hasta que el pH de la disolución final de lavado
era de 7-8. Se retiró el agua y se substituyó por tampón de
fosfato (I), y las partes se lavaron durante 5 minutos.
(5) Se retiró la disolución anterior, se substituyó por
tampón de fosfato (I) que contenía 0,05% de gammaglobulina
15 bovina, y las partes se agitaron 30 minutos en esta diso-
lución. (6) Se retiró la disolución de gammaglobulina, se
substituyó por agua, y las partes reactivas inferiores se
lavaron 5 minutos. Este procedimiento de lavado se repetió
dos veces. Se retiró el agua y se substituyó por tampón de
20 fosfato (II), y las partes se lavaron durante 5 minutos.
(7) La disolución se substituyó por 600 ml de un tampón de
fosfato II que contenía 2% de glutaraldehído, y las partes
inferiores se agitaron durante 60 minutos a temperatura
ambiente en esta disolución. (8) Se quitó la disolución de
25 glutaraldehído, se substituyó por 600 ml de agua, y las par-
tes se lavaron durante 5 minutos. Este procedimiento de la-
vado se repetió dos veces. El agua se retiró y se substituyó
por tampón de fosfato (III), y las partes se lavaron duran-
te 5 minutos. (9) El tampón se substituyó por tampón de
30 fosfato (III) que contenía anticuerpos de digoxina (de ca-

1 bra) a dilución 1:325.000 - 1:335.000, 0,1% de albúmina de
suero bovino, y las partes se agitaron durante dos horas a
temperatura ambiente en esta disolución. (10) La disolu-
ción de tratamiento se sustituyó por 600 ml de agua, y las
5 partes reactivas inferiores se lavaron durante 5 minutos.
(11) El agua se sustituyó por 600 ml de tampón de glicina
(I) y las partes se agitaron a temperatura ambiente duran-
te 30 minutos. (12) Se quitó el tampón de glicina y se
sustituyó por 600 ml de tampón de fosfato (II) y las partes
10 se lavaron durante 5 minutos. Este procedimiento de lavado
se repitió dos veces. (13) Se retiró el tampón de fosfato
y se sustituyó por 600 ml de tampón de fosfato (II) que
contenía 2% de poli(alcohol vinílico), y las piezas se agi-
taron durante 30 minutos. (14) Las partes reactivas infe-
15 riores se secaron en vacío durante unas dos horas. (15) A
las partes reactivas inferiores se les unieron partes supe-
riores inertes por ajuste a presión, dando así un tubo de
ensayo convencional adecuado para uso en procedimientos de
RIA en fase sólida. La parte superior inerte se componía
20 de polipropileno y tenía una longitud de alrededor de 60 mm.

EJEMPLO 5

Se siguió el procedimiento dado en el Ejemplo 4
para recubrir partes reactivas inferiores con anticuerpo
25 para la triyodotironina (T_3), excepto en que la dilución de
la disolución de recubrimiento de anticuerpo en la operación
(9) era de 1:300.000 y el anticuerpo era de cabras. Se pre-
pararon lotes de varios cientos de partes reactivas inferio-
res ajustando el volumen de disolución de tratamiento con
30 base en 6,0 ml por parte.

EJEMPLO 6

Se siguió el procedimiento dado en el Ejemplo IV para recubrir partes inferiores reactivas con anticuerpo para la tiroxina (T_4), excepto que la dilución de la disolución de recubrimiento de anticuerpo en la operación (9) era de 1:2000 y el anticuerpo era de conejos. Se prepararon lotes ajustando el volumen de disolución de tratamiento a una base de 6,0 ml por parte.

EJEMPLO 7 T_4 -RIA

En un soporte de tubos de ensayo convencionales se colocan 14 tubos recubiertos de anticuerpo para tiroxina preparados según esta invención. A cada tubo se le añade con pipeta 1 ml de mezcla de reacción de tiroxina que contiene tampón de veronal (0,076 M, pH 8,6), 0,01% de azida de sodio, Mg ANS, 900 microg/ml, y 200 picog./ml (pg/ml) de tiroxina I-125, de 0,1 microcurios/ml. A cada tubo, excepto a dos, se le añadieron con pipeta 25 microlitros de suero patrón en la dilución apropiada de tiroxina, es decir 0 ng por ml en los tubos 1 y 2; 2,0 ng por ml en los tubos 3 y 4; 5 ng por ml en los tubos 5 y 6; 10 ng por ml en los tubos 7 y 8; 20 ng por ml en los tubos 9 y 10, y 40 ng por ml en los tubos 11 y 12. A los tubos 13 y 14 se les añaden con pipeta 25 microlitros de sueros desconocidos. Se agita el soporte suavemente durante 5 a 10 segundos y después se incuban en un baño de agua durante alrededor de una hora a unos 37°C. Se retira el soporte de los tubos y después se decanta cuidadosamente el contenido de todos ellos. Se añaden dos ml de agua destilada en cada uno de los tubos

1 y se decanta. Se hace recuento de impulsos de los tubos en un contador gamma durante un minuto. Los cálculos se hacen como sigue:

5 1. Se calcula el recuento neto por minuto para todos los patrones, restando el recuento promedio de impulsos de fondo del instrumento.

2. Se expresa el recuento corregido para cada juego de patrones en tanto por ciento del promedio (0 ng por ml) de recuento patrón ($\% B^{**}/BO^{***}$)

10

$$\% B/BO = \frac{\text{recuentos corregidos por minuto de patrón}}{\text{recuentos corregidos por minuto de (0 ng por ml)}} \times 100$$

* B = tanto por ciento fijado a todos los demás tubos

15 *** BO = tanto por ciento fijado al patrón de 0 ng por ml.

3. Usando papel gráfico semilogarítmico, se representa el $\% B/BO$ para cada concentración patrón, en función de la concentración de T_4 en ng por ml.

20

Procedimiento real

Se obtuvieron los resultados siguientes siguiendo el procedimiento anterior:

25

30

15097

1	Muestra (ng/ml)	Recuento posterior promedio (neto) (Impulsos por minuto)	B/B (%)
	0	32591	100%
	2	25525	78,3
5	5	20909	64,2
	10	14774	45,8
	20	9916	30,4
	40	6802	20,9
	Desconocida	17603	54,0

10 Una gráfica de los resultados anteriores indica la sensibilidad y reproductibilidad del ensayo.

EJEMPLO 8

Ensayo de absorción de T_3

15 En un soporte convencional de tubos de ensayo se colocan 6 tubos recubiertos de anticuerpo para T_3 preparados según esta invención. A cada tubo se le añaden con pipeta 1 ml de mezcla de reacción de T_3 que contiene tris-(hidroximetil)aminometano 0,05 M, pH 7,3, 0,05% de azida de sodio, 100 pg/ml de triyodotironina I-125. A cada uno de

20 un grupo de 3 tubos se le añaden con pipeta 25 microlitros de suero patrón, y a los otros 3, se les añaden con pipeta 25 microlitros de sueros desconocidos. Se agita suavemente el soporte de tubos durante 5 a 10 segundos, y después se

25 incuban en un baño de agua durante alrededor de una hora a unos 20-26°C. Se retira el soporte y después se decanta el contenido de todos los tubos cuidadosamente. Se añaden dos ml de agua destilada a cada tubo y se decanta. Se hace recuento de impulsos de los tubos en contador gamma durante

30 un minuto. Los cálculos se hacen como sigue:

1 1. Se calcula el recuento neto por minuto para todos los patrones restando el recuento medio de fondo del instrumento.

5 2. Se calcula el Índice de capacidad de fijación de Triyodotironina (TBC) para cada muestra de suero, por medio de la fórmula siguiente:

$$\text{Índice de TBC} = \frac{\text{Recuento neto por minuto de patrón}}{\text{Recuento neto por minuto de suero desconocido}} \times \text{Factor de normalización}^{25}$$

10

* Se determina a partir del suero patrón.

Como en los anteriores métodos y productos podrían hacerse varios cambios sin separarse del objeto de esta invención, se pretende que debe entenderse como ilustrativa toda la descripción anterior. Ha de entenderse, por lo tanto, que la invención no está limitada salvo por lo definido en las reivindicaciones anexas.

15

20

25

30

15097

- REIVINDICACIONES -

5 Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10 1ª.- Un recipiente hueco y alargado adecuado para uso en un procedimiento inmunológico o enzimático, que comprende (a) una parte reactiva inferior compuesta de un material polímero, estando dicha parte cerrada por un extremo y teniendo sobre al menos una parte de su superficie interior un recubrimiento de una proteína inerte a la que es-
15 tá unida una sustancia biológicamente activa, y (b) una parte superior inerte separable conectada con dicha parte inferior y en comunicación con ella.

20 2ª.- Un recipiente según la reivindicación 1ª, en el que dicha sustancia biológicamente activa es un anticuerpo.

3ª.- Un recipiente según la reivindicación 2ª, en el que dicha parte reactiva tiene dicho recubrimiento sobre una parte de su superficie interior y una parte de su superficie exterior.

25 4ª.- Un recipiente según la reivindicación 3ª, en el que dicha sustancia anticuerpo está unida de modo covalente a dicha proteína inerte.

5ª.- Un recipiente según la reivindicación 4ª, en forma de un tubo.

30 6ª.- Un recipiente según la reivindicación 4ª, en

**POOR
QUALITY**

1 - el que dicha proteína inerte es gelatina o gammaglobulina
bovina.

5 7ª.- Un recipiente según la reivindicación 4ª,
en el que dicha parte reactiva se compone de un copolíme-
ro de etileno y ácido acrílico.

8ª.- Un recipiente según la reivindicación 4ª,
en el que dicha sustancia biológicamente activa está uni-
da de modo covalente con un agente de copulación de aldehi-
do.

10 9ª.- Un recipiente según la reivindicación 4ª,
en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo para triyodoti-
ronina, tiroxina o digoxina.

15 10ª.- Un recipiente según la reivindicación 4ª,
en el que dicha proteína inerte es gammaglobulina bovina,
dicho agente de copulación es glutaraldehído y dicha parte
inferior se compone de un copolímero de polietileno y áci-
do acrílico y dicha parte superior es de polipropileno.

20 11ª.- Un método perfeccionado de análisis radio-
inmunológico inmunoquímico o enzimático para determinar la
concentración de un miembro seleccionado del grupo que cons-
ta de un antígeno y hapteno en una cantidad medida de una
muestra acuosa, en el que dicha disolución acuosa se pone
en contacto con (1) un soporte insoluble al que se ha uni-
do una sustancia biológicamente activa capaz de reaccionar
25 con dicho miembro, y (2) una cantidad medida de un miembro
marcado con un trazador para formar, tras un equilibrado
sustancial, un sistema de 2 fases que contiene una fase
sólida que tiene una parte del miembro marcado y miembro no
marcado unida a dicha sustancia biológicamente activa, y
30 una fase líquida que contiene el resto del miembro marcado
no unido y miembro no marcado, se separan las dos fases y
30068 se determina la concentración midiendo la radiactividad de

1 -al menos una de las fases, siendo el valor de la radiac-
tividad una función de la concentración de dicho miembro
en la muestra acuosa, cuyo perfeccionamiento comprende
5 usar como soporte insoluble el recipiente según la reivindi-
cación 1ª.

12ª.- Un método según la reivindicación 11ª, en
el que dicha sustancia biológicamente activa es un anti-
cuerpo.

10 13ª.- Un método según la reivindicación 12ª, en
el que dicha parte reactiva tiene dicho recubrimiento so-
bre una parte de su superficie interior y una parte de su
superficie exterior.

15 14ª.- Un método según la reivindicación 13ª, en
el que dicho anticuerpo está unido de modo covalente a di-
cha proteína inerte.

15ª.- Un método según la reivindicación 14ª, en
el que el recipiente es en forma de un tubo.

20 16ª.- Un método según la reivindicación 15ª, en
el que dicha proteína inerte es gelatina o gammaglobulina
bovina.

17ª.- Un método según la reivindicación 16ª, en
el que dicha parte reactiva se compone de un copolímero de
polietileno y ácido acrílico.

25 18ª.- Un método según la reivindicación 17ª, en
el que dicha sustancia biológicamente activa está unida de
modo covalente con un agente de copulación de aldehído.

19ª.- Un método según la reivindicación 18ª, en
el que dicho anticuerpo es un anticuerpo para triyodotiro-
nina, tiroxina o digoxina.

30 20ª.- Un método según la reivindicación 19ª, en

1 el que dicha proteína inerte es gammaglobulina bovina, di-
cho agente de copulación es glutaraldehido y dicha parte
inferior se compone de un copolímero de polietileno y ácido
acrílico, y dicha parte superior es de polipropileno.

5 21ª.-Un recipiente hueco y alargado junto con un
método perfeccionado de análisis radioinmunológico immuno-
químico o enzimático.

10 Tal y como se ha descrito en la Memoria que ante-
cede, representado en los dibujos que se acompañan y con
los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de treinta y cinco hojas es-
critas a máquina por una sola cara.

15 Madrid, 01.JUL.1978

Alberto de Elizaburu
For Power,

20 

25

30

30068
jga



FIG. 1

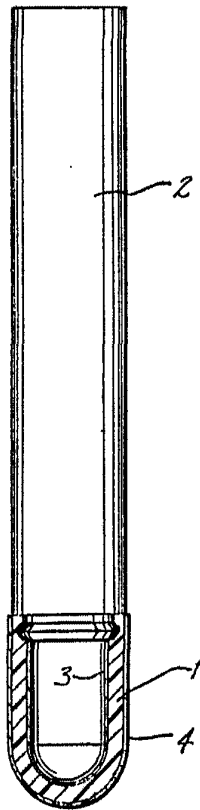


FIG. 2

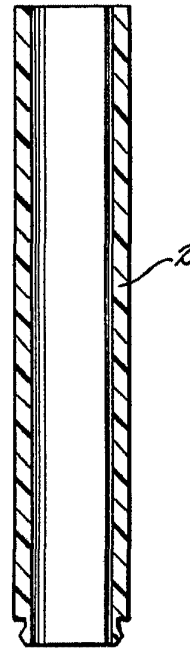


FIG. 3

