

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

10 ABR. 1978
CONCEDIDA

PATENTE DE INVENCION

ES

11

21

22

NUMERO
462365

A1

FECHA DE PRESENTACION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
39018/76	18 Septiembre 1976	Inglesa
P 27 36 527.1	12 Agosto 1977	Alemania

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	GO 1N	

54 TITULO DE LA INVENCION

"Procedimiento y dispositivo para la detección de una proteína fijadora específica y la correspondiente sustancia susceptible de fijarse con ella".

71 SOLICITANTE (ES)

BOEHRINGER MANNHEIM GmbH.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

6800 Mannheim-Waldhof, Sandhofer Strasse 112-132 (Alemania)

72 INVENTOR (ES)

Dr. David John Goldie, Dr. Adel Abbas Ahmed Ismail y Peter Michael West.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

Carlos Fernández Candelas

El invento concierne a un procedimiento para la detección y para la determinación de un componente de la reacción entre una proteína fijadora específica y la correspondiente sustancia capaz de fijarse con ella con aprovechamiento de la afinidad de fijación de estos componentes entre sí, en un sistema automatizado con una corriente de líquido que fluye de un modo continuo, especialmente en un procedimiento de ensayo de inmunidad.

Los procedimientos de ensayo de inmunidad (a saber, el ensayo de radioinmunidad (RIA), el ensayo de inmunidad por enzima (EIA) el ensayo de inmunidad por fluorescencia (FIA)) son utilizados en todo el mundo en laboratorios clínicos. Aunque originalmente se emplean en el sector de la endocrinología, estas técnicas son utilizadas, por lo tanto, en los más diferentes sectores, incluyendo la inmunología, la oncología, la farmacología química, la microbiología y la hematología. Dado que pueden prepararse anticuerpos con intensa afinidad para sustancias tanto inmunógenas como no inmunógenas, son posibles determinaciones de prácticamente cualquier compuesto en concentraciones muy pequeñas. Además de ello, la determinación se puede llevar a cabo en una muestra relativamente impura, que sólo es poco purificada o no lo es de ningún modo antes del análisis.

Hasta ahora la precisión de tales ensayos de inmunidad, tales como el ensayo de radioinmunidad y procedimientos de análisis similares, era relativamente peque-

ña en comparación con otros métodos, que son utilizados -
en laboratorios químicos clínicos. Esto se debe probable-
mente al hecho de que la mayor parte de los ensayos de in-
munidad se llevan a cabo actualmente de modo manual, de -
5 lo que resultan problemas, tales como una precisión rela-
tivamente pequeña, un rendimiento pequeño, cansancio para
el personal y la larga duración de la determinación. La -
automatización es deseada desde hace mucho tiempo en este
sector, constituyendo los sistemas que hasta ahora se -
10 pueden adquirir en el comercio (tales como LKB, Baird y Tat-
lock, Micromedic y Centria) sistemas de análisis individua-
les, que abarcan la utilización de dilutores de muestras,
introduciéndose una serie de muestras en el dilutor de mues-
tras. Además de ello, en determinadas etapas se hace neces-
15 saria una intervención manual, tal como la retirada del ar-
mazón de muestras desde el dispositivo incubador, la cen-
trifugación, la separación de los líquidos sobrenadantes, y
la transferencia a un equipo contador. En general, estos -
sistemas son costosos, no son mecánicamente dignos de con-
20 fianza, son relativamente poco flexibles y aportan en gene-
ral solo pocas ventajas.

Por lo tanto, se pretendió crear un procedimien-
to relativamente sencillo, flexible y totalmente automáti-
co que fuese apropiado para todos los laboratorios. La -
25 atractividad de este procedimiento debería consistir tam-
bién en que se podría recurrir a los dispositivos y las po-
sibilidades que se pueden encontrar ya en un laboratorio -

aunque sea solo un poco moderno para química clínica. El procedimiento deberá ser flexible y universal, de manera que se puedan llevar a cabo todos los análisis usualmente realizados con dificultades mínimas. Finalmente el procedimiento deberá ser barato de realizar y deberá exigir costos de funcionamiento pequeños en comparación con los ensayos de radioinmunidad realizados manualmente, semiautomáticos o automáticos y otros similares.

Un procedimiento totalmente automatizado con corriente de líquido que fluya de un modo continuo cumpliría con seguridad los requisitos antes establecidos. Las partes más críticas de tal procedimiento son por un lado el equipo, que separa los restos libres de los restos marcados presentes en la fase insoluble, y por otro lado en el caso del ensayo de radioinmunidad, pero no en los otros ensayos, un sistema contador para la determinación de la radioactividad. En Anal. Biochem. 65 (1975) 355-361 se describe un sistema automático con circulación continua, que utiliza anticuerpos fijados a glóbulos rojos de la sangre. Para la separación del antígeno marcado fijado a los anticuerpos con respecto del resto libre, los eritrocitos son precipitados por floculación o aglutinados con ayuda de Polybrene (bromuro de hexametrimina) y son separados por decantación del líquido sobrenadante. En Clin. Chim. Acta 63 (1975), 69, se describe un sistema de fases sólidas, que se basa en la utilización de anticuerpos, que están fijados de modo covalente a óxido de hierro recubierto con polímeros (Enzacryl).

Tanto para mezclar los participantes en la reacción como -
también para separar la porción marcada fijada a los anti-
cuerpos respecto de la fracción libre, se utiliza un elec-
troimán. Este principio constituye la base para un sistema
5 plenamente automatizado.

En los últimos tiempos se ha informado acerca de
un sistema "en línea" automático con la designación "Gamma
flow", en el cual la separación del ligando libre respecto
del ligando marcado fijado se logra con ayuda de una colum
10 na separadora en lecho mixto a base de carbón activo y re-
sina Dowex.

Todos los sistemas plenamente automáticos con cir-
culación continua que son conocidos tienen sin embargo di-
ferentes desventajas o limitaciones. El sistema que utili-
15 za anticuerpos, fijado a glóbulos rojos de la sangre no es
apropiado debido a su pequeño rendimiento de realización (10
muestras por hora) y manifiesta una pequeña sensibilidad y
una pequeña precisión. El sistema que abarca la utilización
de partículas magnéticas exige una separación magnética extre
20 madamente costosa, que hace complicado y caro el dispositivo.
La utilización de una columna de lecho mixto para la separación
de los restos fijados con relación a los restos libres tiene
también sus limitaciones, ya que el sistema no puede ser uti-
lizado universalmente para separar de modo eficaz todos los
25 tipos de material antigénico. Por ejemplo, con ayuda de tal colum-
na no se pueden separar inmunoglobulinas ni tampoco antígenos
de elevado peso molecular. El sistema tampoco es apropiado -

para el sistema de inmunidad por enzima, en el cual la diferencia de carga y de masa entre los restos fijados y los restos libres es muy escasa.

El presente invento se basa, por lo tanto, en la misión de crear un procedimiento sencillo, flexible y plenamente automático que sea apropiado especialmente para la realización del ensayo de radioinmunidad, del ensayo de inmunidad por enzima y del ensayo de inmunidad por fluorescencia.

Por lo tanto, es objeto del invento un procedimiento para la detección y para la determinación de un componente de la reacción entre una proteína fijadora específica y la correspondiente sustancia capaz de fijación, con aprovechamiento de la afinidad para fijación de estos componentes entre sí en un sistema automático con corriente de líquido que fluye continuamente, el cual procedimiento está caracterizado porque, sucesivamente, mezclas del material de muestra con una determinada cantidad de un componente de la reacción en forma marcada y de otro componente en una forma fijada a un soporte o substrato, insoluble, en forma de partículas, o fácilmente transformable a un estado insoluble, en forma de partículas, son incorporadas en la corriente de líquido de modo tal que las mezclas individuales permanecen separadas, son incubadas e introducidas continuamente en un equipo separador, en el cual eventualmente después de previa insolubilización del soporte se separa al menos una parte de la fase líquida con respecto de

la fase sólida y en una de las fases separadas se mide la cantidad del componente marcado contenido en ella.

En el caso del ensayo de radioinmunidad la medición se efectúa con un equipo contador, en el cual se determina la radioactividad de cantidades sucesivas de la fase que ha de ser medida. En el caso del ensayo de inmunidad por fluorescencia y del ensayo de inmunidad por enzima se utilizan para la detección y determinación un fluorímetro y un colorímetro.

Como proteína fijadora específica entran en consideración, dentro del marco del invento, anticuerpos, anti-anticuerpos, receptores de hormonas, otras proteínas capaces de fijar hormonas, tales como por ejemplo la globulina fijadora de tiroxina TBG, el factor intrínseco, y otros similares.

Como la sustancia capaz de fijación correspondiente se entiende un compuesto que es capaz de formar con la proteína fijadora específica una fijación o unión por lo general a modo de complejo. Ejemplos típicos de ellos son antígenos, haptenos, esteroides, anticuerpos y otras sustancias capaces de fijación con una proteína fijadora específica.

Por lo menos uno de los componentes de las sustancias capaces de fijación, es decir la proteína fijadora específica o la sustancia capaz de fijación con ella, se emplea en forma marcada. Puede tratarse en tal caso tanto de la proteína fijadora específica como también de la corres -

pondiente sustancias capaz de fijación. Como sistemas de marcado entran en consideración, por ejemplo, la introducción de átomos o grupos radioactivos, un marcado con enzimas, con coenzimas o con substratos o introducción de sustancias fluorescentes o absorbentes de luz. También se pueden utilizar otros sistemas de marcado en los cuales el resto es excitado por otro método físico, por ejemplo resonancia de rotación o "spin" electrónica.

Ejemplos típicos de átomos radioactivos utilizables dentro del marco del invento son yodo, tritio, azufre, selenio, cromo, carbono y fósforo. Enzimas utilizadas con frecuencia como sistema de marcado son por ejemplo peroxidasa, glucosa oxidasa, fosfatasa alcalina y β -glucosidasa. Sustancias fluorescentes apropiadas típicas son rodamina, isotiocianato de fluoresceína (FITC) y derivados umbeliferílicos.

El componente marcado de la reacción (trazador) puede ser la misma sustancia que la que se ha de determinar en el procedimiento, es decir cuando, por ejemplo, se trata de un antígeno, puede ser un antígeno marcado. No obstante, el trazador puede ser también otra sustancia capaz de fijación con el componente a determinar, por ejemplo otro anticuerpo marcado.

Como soportes entran en consideración un material insoluble, en forma de partículas o de forma celular, tal como por ejemplo Sephadex poroso, Sepharose poroso, celulosa microcristalina, látex, esferitas de vidrio o células, ta

les como eritrocitos con los cuales está fijado firmemente material de los anticuerpos o el antígeno. La ocupación de espacio o el volumen de este soporte no perjudica a la reacción entre antígenos y anticuerpos, y hace posible una separación conveniente de los restos fijados con relación de los restos libres. Alternativamente se pueden utilizar materiales de soporte porosos en forma de partículas, capaces de intercambiar iones (tales como un gel intercambiador de iones Sephadex o una resina) para separar el componente marcado no fijado, por ejemplo el antígeno, con respecto de la parte del componente marcado fijada al otro componente específico de fijación, es decir por ejemplo al antígeno. Esta forma de realización es apropiada para los componentes que se comportan como restos aniónicos o catiónicos, tales como -- por ejemplo algunos haptenos. En esta forma de realización, por ejemplo, los anticuerpos no están fijados a un soporte en forma de partículas, sino que se utilizan como tales después de una dilución apropiada del antisuero.

Por lo general en el procedimiento de acuerdo con el invento se utiliza un soporte de antemano sólido, en forma de partículas. No obstante, también es posible utilizar un soporte líquido pero precipitable, preferiblemente un soporte precipitable de modo reversible. En tal caso se trata de soportes que no se presentan constantemente como sustancias sólidas. Ejemplos de ellos son, por ejemplo, un latex a base de poliacrilamida que, dependiendo del valor de pH,

se presenta en forma líquida o en forma sólida. Esta forma de realización del invento tiene la ventaja de que la reacción de inmunidad propiamente dicha puede ser realizada en fase líquida homogénea, pero antes de la separación de fases se transforma al soporte a la forma sólida, por ejemplo mediante modificación del valor del pH. En la forma preferida de realización, a continuación, el soporte precipitado puede ser licuado nuevamente de modo reversible, lo cual tiene ventajas para la precisión de la reacción de medición, caso de que sea sometida a la medición la fase en la que se encuentran las partes sólidas.

La precipitación del soporte puede efectuarse de modo especialmente conveniente mediante la corriente de agente diluyente, que en la forma preferida de realización del invento se introduce poco antes de llegar a la membrana de filtración, según la filtración forzada por dilución que más abajo se va a explicar. El agente diluyente puede consistir por lo tanto, por ejemplo, en un líquido orgánico, en una solución de sales o en una solución tampón, que da lugar a la precipitación por modificación de la concentración de iones, del valor del pH o de parámetros similares.

La separación del componente marcado fijado con respecto del componente marcado libre se logra preferiblemente mediante utilización de una membrana de elevada porosidad. Se hace fluir la corriente de líquido junto a un lado de la membrana, diluyéndosela aguas arriba, con el fin de aumentar la presión. También se puede aplicar una pre-

si3n negativa al otro lado (lado del filtrado) de la membra
na. Por lo tanto, se obtiene la primera fase en este lado -
del filtrado, mientras que la segunda fase, que contiene -
las porciones insolubles, es obtenida aguas abajo en el la-
5 do del retenido. La cantidad y el tipo del agente de dilu-
ci3n y/o la cantidad del l3quido filtrado a trav3s de la -
membrana se pueden ajustar a deseo. Esta t3cnica es designa
da como filtraci3n forzada por diluci3n o filtraci3n impera
tiva por diluci3n.

10 Aunque en el caso de la utilizaci3n de un sistema
con circulaci3n continua en el ensayo de inmunidad deber3an
esperarse una serie de problemas, 3stos sorprendentemente -
no han aparecido en un grado apreciable. A estos problemas
pertenecen la dificultad de la separaci3n del componente fi
15 jado y del componente marcado libre al final de la determi
naci3n, un tiempo de incubaci3n insuficiente, que impide -
que la reacci3n transcurra hasta tanto que se produzcan una
precisi3n y una sensibilidad satisfactorias, la dificultad
del bombeo de cantidades peque1as de componente marcado, ya
20 que especialmente existe una inclinaci3n a que en las conduc
ciones del sistema aparezcan p3rdidas por adsorci3n, y pro
blemas de arrastre. Investigaciones previas han mostrado, -
sin embargo, que peque1as cantidades de componentes marca
dos y no marcados pueden ser bombeadas en un sistema con -
25 circulaci3n continua, por ejemplo con utilizaci3n de segmen
tos de aire, sin que aparezcan problemas graves en lo que -
se refiere a p3rdidas por adsorci3n o por un arrastre de -

los materiales.

Para explicar aún más el invento se describirán seguidamente algunas formas de realización, haciendo referencia a los dibujos anejos.

5 En éstos:

La Figura 1 muestra una vista en alzado en sección esquemática de un dispositivo o equipo separador de acuerdo con el invento;

10 La Figura 2 muestra una vista en alzado en sección vertical esquemática de un cabezal contador de radioactividad;

La Figura 3 muestra un diagrama por bloques de un sistema de ensayo de radioinmunidad según el invento;

15 La Figura 4 muestra un diagrama por bloques de un sistema de ensayo de inmunidad por enzima según el invento; y

La Figura 5 muestra una curva patrón trazada con el sistema de la figura 4.

20 El procedimiento utiliza en las etapas iniciales sistemas continuos de circulación usuales, y dispositivos, que no van a explicarse con mayor detalle. Las muestras del trazador, es decir, por ejemplo, el antígeno marcado y el componente presente en la fase sólida, por ejemplo el anticuerpo, son introducidos en cantidades dosificadas con exactitud, que son determinadas por el tamaño de tubos del distribuidor tubular. Entre las muestras se presenta un líquido de lavado, que puede ser identificado de manera caracte

25

rística, por ejemplo por coloración o tinción. Esto es importante sólo en el caso del ensayo de radioinmunidad, pero no lo es en otro sistema de ensayo de inmunidad, ya que entonces se puede controlar el equipo contador de manera -
5 tal que escoja la cantidad a determinar en base de esta -
propiedad característica. La corriente interrumpida en segmentos por sectores de aire es transportada a través de un serpentín tubular con temperatura controlada, con lo cual se logra un buen mezclado a fondo de los reactivos en el -
10 transcurso del tiempo de incubación. El tiempo de incubación, según B. Huber, puede ser de 25 minutos o menor. La corriente de líquido es transferida entonces al equipo separador, que se representa en la figura 1. En éste se realiza una filtración forzada por dilución. El mismo abarca
15 un bloque dividido, que consiste preferiblemente en material sintético transparente, que abarca entre las mitades 1 y 2 un filtro 3 a base de un material poroso de material sintético, nylon, teflón u otro material sintético orgánico o -
inorgánico. El tamaño de poros de estas membranas deberá -
20 ser uniforme y grande (por ejemplo 10 μ m), pero menor que las partículas del soporte o que los materiales que son utilizados para absorber los ligandos no fijados. El semibloque 1 posee una conducción de entrada 4 para la corriente en forma de segmentos y otra conducción de entrada 5 para
25 un agente diluyente. Estas conducciones se reúnen aguas -
arriba de una cámara separadora 6, que es formada por rebajos semicilíndricos opuestos en los semibloques 1 y 2, y es

separada por la membrana 3. Junto al extremo opuesto de la cámara 6, aguas abajo de las conducciones de entrada, se encuentra en el semibloque 1 una conducción de salida 7 con sección transversal ajustable (no mostrada) y en el semibloque 2 se encuentra una conducción de salida 8. El volumen de la mezcla de líquido y aire, que sale de la conducción de salida 7, es ajustado y es llevado a concordancia con la magnitud de la depresión, que es aplicada a la conducción de salida 8.

10 Durante el trabajo, la corriente de fluido segmentada es diluida mediante el agente diluyente, antes de llegar a la cámara 6 y de ser conducida en forma segmentada por debajo de la membrana 3. La presión proporcionada por la adición del agente diluyente y la limitación de la circulación hacia fuera de la corriente a través de la conducción de salida 7 obliga al líquido en exceso y a partículas, que son más pequeñas que el tamaño de poros del filtro, a pasar a través de la membrana. La filtración es ayudada también por una presión negativa correspondiente, 15 que es aplicada al orificio de salida 8. Los filtrados, que contienen trazadores no fijados, en el ejemplo, por lo tanto, antígenos, pueden ser utilizados para la determinación del resto libre, recontando la radioactividad en el caso del ensayo de radioinmunidad, midiendo la intensidad de la fluorescencia o de una variable de la reacción de enzima, 20 por ejemplo la absorción, en el caso del ensayo de inmunidad por fluorescencia o del ensayo de inmunidad por enzima. 25

El trazador (antígeno) fijado a la fase sólida permanece a causa de su gran tamaño de partículas (que usualmente se encuentra por encima de 20 μm) en la corriente segmentada y es recogido a la salida 7. El material puede ser introducido entonces en un equipo de detección, tal como el que se describe más abajo para el recuento de la radioactividad.

Es posible de este modo recontar los trazadores fijados o los trazadores no fijados en función de la corriente de salida escogida. En cualquier caso se puede utilizar la intensidad de la presión negativa y la cantidad del agente diluyente introducido para controlar dentro de límites muy estrechos y exactos el volumen filtrado a través de la membrana.

Muchas de las membranas de porosidad elevada adoptan con facilidad una carga negativa electrostática y la mantienen, con lo cual se puede influir de modo múltiple sobre el trabajo de la membrana. Por ejemplo, pueden retenerse partículas que son más pequeñas que el tamaño de poros. Sin embargo, la carga electrostática puede también ser útil por mantener en un mínimo una obstrucción por partículas mayores, presentes en el líquido, así como por partículas procedentes del aire introducidas en el sistema. La intensidad de la carga electrostática depende del valor del pH, y puede ser modificada por la utilización de agentes tampones o amortiguadores diluyentes con el valor del pH deseado. Cuando la membrana consiste en un material con

ductor, se puede utilizar un manantial exterior para influir sobre la carga. El agente diluyente puede ser también una solución, que ejerza una función especial. Así, por ejemplo, el mismo puede contener una sustancia, tal como poli(alcohol

5 vinílico) que recubre la membrana y disminuya de este modo en caso deseado la carga electrostática. Como agente diluyente puede utilizarse también un líquido que produzca la precipitación del soporte, por ejemplo una solución de sales que actúe precipitando sobre el soporte mediante aumento de

10 la concentración de iones.

El recuento de la radioactividad puede ser llevado a cabo en un dispositivo tal como el que se representa en la figura 2, que abarca un cabezal medidor de rayos γ 21 -- usual, que aloja una cubeta cerrada 22. Esta se encuentra --

15 provista con un tubo de entrada 23, que coopera con un receptor eléctrico 24, y con un tubo de salida 25, al que se aplica una depresión. El tubo de salida 25 está unido a través de un tubo 26 y una válvula 27 con una bomba de tubo de

20 formable u otro dispositivo de aspiración, siendo controlada la válvula 27 por el receptor 24 y un equipo cronometrador (no representado). Alternativamente, se puede suprimir el tubo 26, y la válvula 27 puede ser conectada directamente con el tubo de salida 25.

El receptor 24 responde a las propiedades de --

25 los líquidos de lavado, por ejemplo a su color, en que al reconocerse esta propiedad característica, se cierra la --

válvula 27 llenándose la cubeta, tras de lo cual comienza el recuento. Después de haber transcurrido un período de --

tiempo previamente determinado, el contador es detenido y ajustado a cero, mientras que la válvula 27 es abierta y la cubeta se retira mediante la depresión que es aplicada - - constantemente a la salida 25. El resultado del recuento -- puede ser expresado, o bien dibujado o indicado de otro modo. Es importante el hecho de que el método de recuento se basa en un nuevo concepto, a saber en un "recuento por introducción simultánea". Investigaciones previas realizadas mostraron que la relación que existe entre el número de los impulsos de recuento y el tiempo sigue una curva, que puede ser reproducida por una ecuación cuadrática. Este método de recuento puede ser ventajoso, ya que, en el caso de utilizarse una minocomputadora, intensas irregularidades dentro de un segmento de muestra pueden conducir a claras desviaciones respecto de una curva calculada. Esto puede ser comprobado y se pueden determinar los errores.

Haciendo referencia a la figura 3 se explicará - adicionalmente a modo de ejemplo el sistema fundamental desarrollado y mejorado adicionalmente, con ayuda de una determinación de antígenos. En este caso los reactivos que contienen el antígeno en el suero o en la orina, tal como arriba se describe, son introducidos a través de los serpentines 31 mantenidos a temperatura constante, en forma de una corriente interrumpida por sectores de aire, en el dispositivo separador 32 representado en la figura 1, en el que discurre la filtración forzada por dilución. De este modo, el antígeno fijado a la fase sólida es separado del antígeno libre y no fijado así como de los otros componen -

tes del suero. Estos últimos son desechados, mientras que -
la corriente en forma de segmentos es mezclada con otro an-
ticuerpo específico (que actúa contra el mismo antígeno), pe-
ro que está marcado con ^{125}I . Resulta una segunda reacción
5 de anticuerpos durante el movimiento a través de otro ser -
pentín 33, mantenido a temperatura constante, lo cual condu-
ce a la formación de un complejo marcado en fase sólida, pre-
sentándose el antígeno entre dos anticuerpos, de los cuales
uno está fijado a la fase sólida (anticuerpo inmovilizado)
10 y el otro está marcado. Según esta reacción, el complejo fi-
jado a la fase sólida es separado, en un segundo equipo se-
parador 34, respecto del anticuerpo libre marcado. La frac-
ción libre es entonces recontada y la fracción fijada es de-
sechada, o se procede a la inversa.

15 El invento puede ser utilizado también para auto-
matizar un ensayo usual de radioinmunidad (es decir un ensa-
yo en el cual se utiliza el anticuerpo como tal, sin haber
sido modificado, por ejemplo fijado a una fase sólida). La
automatización de este ensayo se logra mezclando la corrien-
20 te en forma de segmentos, que contiene el material de análi-
sis incubado (por ejemplo el anticuerpo, el antígeno marca-
do (trazador) y el antígeno no marcado) con un material en
forma de partículas, que es capaz para ello de fijarse o -
bien con los componentes libres o bien con los componentes
25 fijados. Un ejemplo de un material del primero de los tipos
es un gel intercambiador de iones poroso o una resina inter-
cambiadora de iones porosa, que es apropiado para recoger -

partículas aniónicas o catiónicas, mientras que un ejemplo de un material del último de los tipos es un segundo anticuerpo, que está fijado de modo covalente a una matriz de gel porosa, tal como Sephadex o Sepharose.

5 El procedimiento de acuerdo con el invento es -
apropiado también para automatizar la determinación de es-
teroides y medicamentos o drogas, con los cuales no se ne-
cesita de ninguna extracción con un disolvente orgánico. El
procedimiento es apropiado además para automatizar otros mé-
10 todos de investigación, distintos del ensayo de inmunidad.
Por ejemplo, la determinación de toda la capacidad de fija-
ción de hierro abarca la adición de una sal de hierro en -
exceso, con el fin de saturar la proteína de soporte trans-
ferrina. La separación del hierro en exceso puede efectuar-
15 se en un sistema de corriente, mezclándolo con un intercam-
biador de cationes poroso y realizando a continuación la -
filtración forzada por dilución. En el producto filtrado -
se puede determinar entonces el hierro con ayuda de méto-
dos usuales.

20 En resumen se puede comprobar que el procedimien-
to descrito es apropiado para automatizar el ensayo de ra-
dioinmunidad, el ensayo de inmunidad por enzima o el ensa-
yo de inmunidad por fluorescencia, y también otros métodos
de determinación, en los cuales se utilizan como reactivo
25 analítico otros materiales en forma de partículas, tales -
como un gel poroso o una resina porosa. Para lograr mejo-
res resultados, las partículas deberán abarcar una matriz

resistente a la abrasión, que esté conformada con forma esférica y tenga un tamaño uniforme de partículas.

EJEMPLO 1

5 Determinación automática de tiroxina con utilización de una disposición según la figura 4, siendo suprimida la reacción enzimática y medida en el contador la fracción libre que se presenta después del equipo separador. Es posible la realización en el aparato analizador automático Auto-Analyzer de la firma Zehnicon.

10 Intercalamiento del contador y de la cara de contacto intermedia.

1. Cambio de membranas
2. Bombeo del agente tampón para lograr un buen diseño de burbujas a través del filtro - importante !
- 15 3. Bombeo del sistema de marcado para la determinación del grado de recuento total (deberá estar entre 20 y 25.000).
4. Adición de AB y bombeo del colorante a través de la conducción para muestras.
5. Cuando aparezca el colorante, comprobar la fijación por
- 20 activación del contador - ajuste del nivel.
6. Comienzo de la toma de muestras.

Placa de muestras = 5 x '0';

- 25 curva patrón;
- 2 sueros testigo entre 39 y 40;
- 8 muestras;
- 2 sueros testigo, etc.

7. Cálculo de modo usual:

Reactivos.

1. (AB (anticuerpos insolubles). Se disuelven 10 ml de Sepharose T4 hasta 100 ml con tampón de tris-(hidroximetilaminometano)(=Tris) con un valor de pH de 8,5.
2. Sistema de marcado 1,0 ml (10 μ l);
 - 5 40 ml de tampón Tris;
 - 4 ml de albúmina al 5%;
 - 250 mg de A.N.S.
3. Solución de lavado 1,8% de NaCl + 1 ml de Brij/litro, para la utilización, filtrar a través de un filtro de 1 μ m;
- 10 4. Colorante 15% de albúmina de ganado vacuno - 100 ml + 8 ml de colorante verde.
5. Tampón Tris 12 g/l de tampón Tris son ajustados con HCl a un valor de pH de 8,5. Se añaden 2,5 g de azida y se filtra antes de la utilización a través de un filtro de 1 μ m.

15 Soluciones patrón

Solución patrón T4 'A' : 57,21 mg de T4 puro en 6 ml de NaOH 0,1n; se completa con etanol absoluto hasta 50 ml, y se congela a baja temperatura.

Solución patrón T4 "B" : se diluyen 0,1 ml de la solución patrón A con 1,9 ml de tampón Tris, que contiene 0,5% de albúmina y se produce la congelación a muy baja temperatura.

Solución patrón de trabajo: 19,9 ml de albúmina de ganado vacuno al 5% + 0,1 ml de la solución patrón B = 325 nMol/litro. Doble dilución con albúmina humana al 5% (que ha sido tratada con resina) con formación, respectivamente, de 163,82, 41,20 y 10 nMol/litro.

6. Anticuerpos: Se fijan 1 ml de anticuerpo Beneden T4 a 5 g de Sepharose, se diluye con tampón Tris a 100 ml, se

añaden 0,1 g de azida y se produce la congelación profunda de porciones alícuotas, cada una de 10 ml.

Ajuste:

Tiempo de ensayo: 75 segundos Tiempo de lavado: 15 segundos

5 Retardo: 5 segundo Recuento: 55 segundos

Registro 2 V

EJEMPLO 2

Determinación automatizada de tiroxina (T_4) mediante ensayo de inmunidad por enzima, según la figura 4 en la que se representa un esquema de la realización de los experimentos. Es posible la realización en el aparato analizador automático Auto-Analyzer de la firma Technicon.

Las disposiciones previas iguales que en el ensayo de radioinmunidad del ejemplo 1.

15 I. Reactivos

1. Anticuerpos T_4 . Se fijó, de acuerdo con la prescripción del fabricante (Pharmacia), de modo covalente a Sepharose activada con BrCN y se suspendió mediante agitador magnético en tampón Tris-HCl 0,1 M, pH = 8,5, con 0,1% de Brij.

20 2. Trazador,

Se marcó T_4 con peroxidasa (EC 1.11.1.7, Boehringer Mannheim, número de catálogo: 15.629) y se diluyó con tampón de Tris-HCl, pH = 8,5, con albúmina al 0,5%, con 250 mg de A.N.S. (sal (1) amónica de ácido 8-anilino-naftaleno-sulfónico) y 0,1% de Brij hasta un volumen final de 50 ml.

25

3. Ensayo de dilución. Tampón de fosfato 0,2 M, pH = 8,0, con 0,1% de Brij.

4. Mezcla de reacción enzimática.

Tampón de fosfato 0,1 M, pH = 8,0, con 11 mMol de 2,4-di
clorofenol, 1,2 mMol de 4-aminofenazona y 1,5 mMol de -
perborato sódico.

5. Solución de lavado:

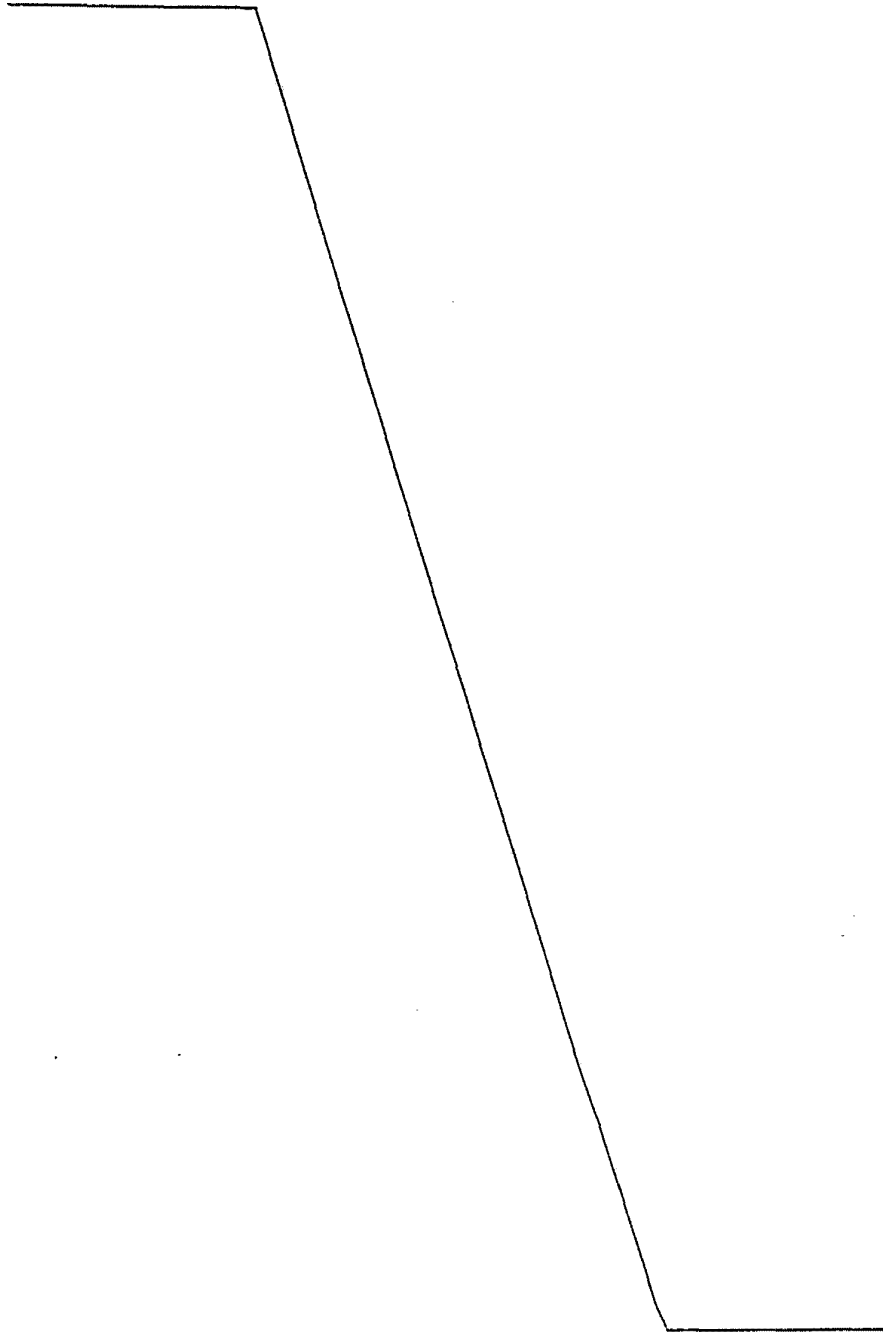
1,8% de NaCl con 0,1% de Brij.

II - Realización:

1. Barrido con solución de lavado y ajuste de un caudal cons-
tante de burbujas a través del separador.
- 10 2. Dosificación del trazador, adición de la mezcla de reac-
ción enzimática, igualación del fotómetro y ajuste del -
escritor: determinación de la actividad del trazador.
3. Adición del anticuerpo T4, comprobación de la fijación -
de trazador, nueva igualación del fotómetro y del escri-
tor,
- 15 4. Comienzo de la toma de muestras; platos de muestras
5 ml de patrón "0" ($=C_0$);
curva patrón;
2 sueros testigo;
- 20 8 muestras;
2 sueros testigo;
8 muestras, etc.
5. Evaluación de los resultados de modo usual según el dia-
grama del escritor.

25 De manera análoga, en el caso de reemplazarse el
sistema de marcado por enzimas por un sistema de marcado por
fluorescencia y por utilización de un fluorímetro se puede -

realizar el ensayo FIA, por ejemplo utilizando un fluorímetro espectral Perkin-Elmer modelo 1000 o un fluorímetro espectral Kontron S FM 22.



- REIVINDICACIONES -

1.- Procedimiento para la detección de una proteína fijadora específica y la correspondiente sustancia susceptible de fijarse con ella, con aprovechamiento de la afinidad de fijación de estos componentes entre sí en un sistema automatizado con corriente de líquido que fluye de modo continuo, caracterizado porque, sucesivamente, mezclas del material de muestras con una cantidad determinada de un componente de la reacción en forma marcada y de otro componente en una forma fijada a un soporte insoluble en forma de partículas o fácilmente transformable en un estado insoluble en forma de partículas, se incorporan en la corriente de líquido de modo tal que las mezclas individuales permanecen separadas, se incuban y se introducen continuamente en un equipo separador, en el que eventualmente después de previa insolubilización del soporte se separa por lo menos una parte de la fase líquida respecto de la fase sólida y en una de las fases separadas se mide la cantidad del componente marcado contenido.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la separación de las fases se efectúa por filtración.

3.- Procedimiento según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la presión en la corriente de líquido que fluye de modo continuo es aumentada antes de llegar a la membrana de filtración mediante introducción de -

otra corriente de líquido.

4.- Procedimiento según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque es disminuida la presión en el lado del filtrado de la membrana de filtración.

5 5.- Procedimiento según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque para la separación de las mezclas de muestras se utiliza una corriente de líquido que fluye - de un modo continuo, segmentada mediante burbujas de gas.

10 6.- Procedimiento, según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque para la separación de las mezclas de muestras la corriente de líquido que fluye de modo continuo es segmentada mediante un líquido inmisible en lo esencial con ella.

15 7.- Procedimiento, según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las mezclas de muestras son introducidas a modo de bloques sin modificación esencial de la - velocidad de circulación en la corriente de líquido que fluye de modo continuo.

20 8.- Procedimiento, según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se utiliza un componente radioactivo o marcado por una enzima o por un resto fluorescente.

25 9.- Procedimiento, según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la proteína fijadora específica - es un anticuerpo o un anticuerpo o receptor de hormonas, y la correspondiente sustancia capaz de fijación es un antígeno, un hapteno o un anticuerpo o una hormona.

10.- Procedimiento, según reivindicaciones ante-



riores, caracterizado porque se utiliza un soporte soluble precipitable.

5 11.- Procedimiento, según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se utiliza un soporte precipitable de modo reversible.

12.- Procedimiento, según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la precipitación se efectúa mediante la otra corriente de líquido, introducida delante de la membrana de filtración.

10 13.- Dispositivo para la realización del procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado por un dispositivo separador para la separación de al menos una parte de la fase líquida respecto de la fase sólida y por un dispositivo de medición para una de las fases separadas.

15 14.- Dispositivo, según reivindicaciones anteriores, caracterizado por un bloque dividido con dos mitades, que incluyen un filtro, una conducción de entrada para la corriente de muestras, una conducción de entrada para agente diluyente, que se reúnen aguas arriba de una cámara de separación, y una conducción de salida en la mitad de bloque, rebajos opuestos entre sí en las mitades de bloque que forman la cámara de separación, y una conducción de salida en la mitad de bloque.

20 25 15.- Dispositivo, según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el dispositivo de medición contiene un cabezal medidor, en el que está dispuesta una cuba

ta cerrada, que tiene un tubo de entrada con un receptor y un tubo de salida, que está unido con un dispositivo de aspiración, a través de la conducción y de la válvula, que es controlada por el receptor.

- 5 16.- "PROCEDIMIENTO Y DISPOSITIVO PARA LA DETECCION DE UNA PROTEINA FIJADORA ESPECIFICA Y LA CORRESPONDIENTE SUSTANCIA SUSCEPTIBLE DE FIJARSE CON ELLA".

Tal como se describe y reivindica en la presente Memoria Descriptiva que consta de veintisiete hojas escritas a máquina por una sola cara y de sus correspondientes dibujos

10

Madrid, 14 Septiembre 1977

CARLOS FERNANDEZ VARELAS
P.R.

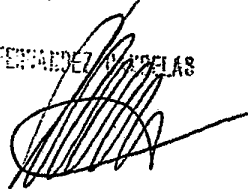


Fig.1

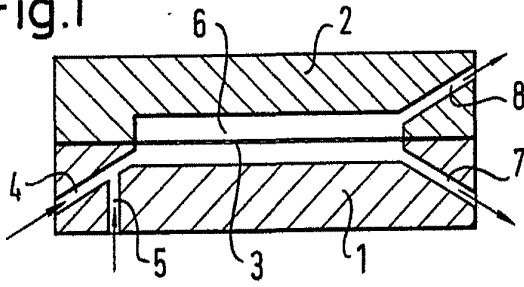
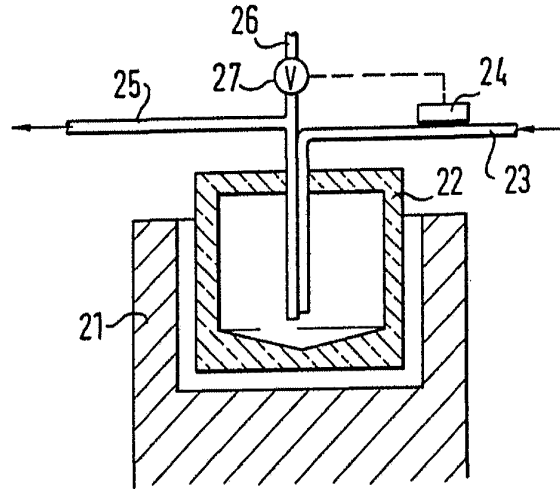
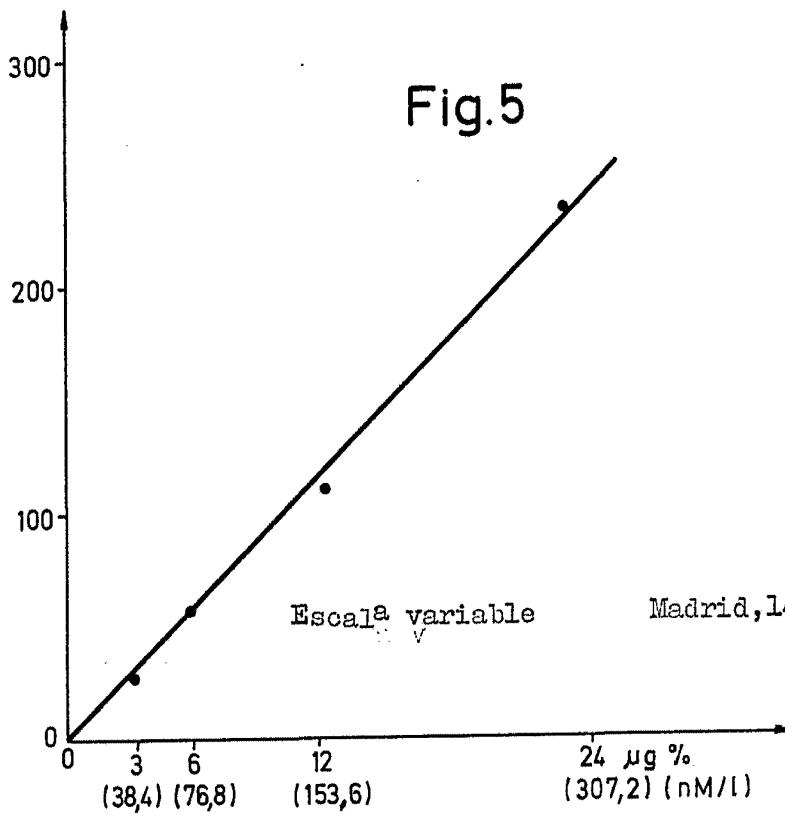


Fig.2



mE 505 nm

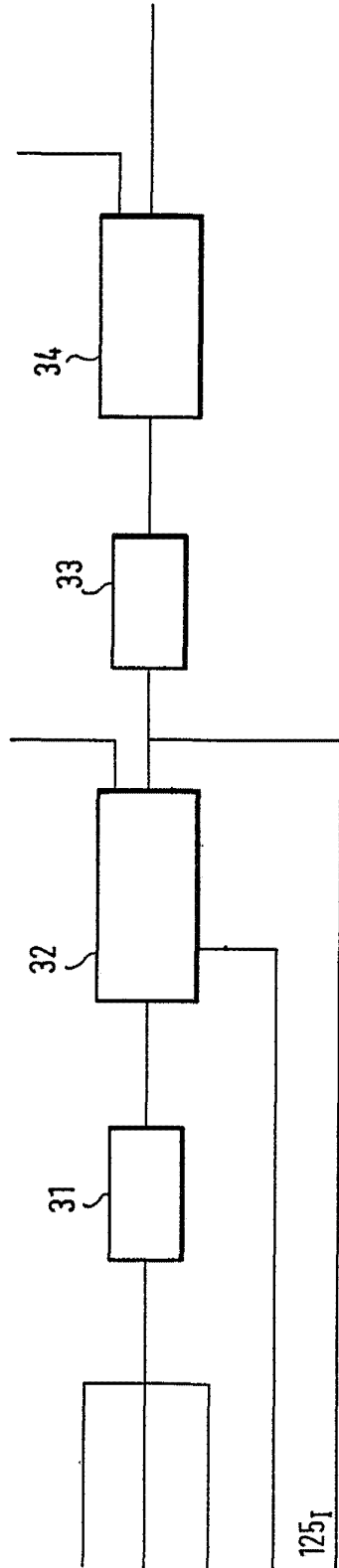
Fig.5



Madrid, 14 Septiembre 1977

Jandy

Fig. 3



Escala variable

Madrid, 14 Septiembre 1977

1251
Ponce

