



ESPAÑA

| | | |
|----|---|---------|
| ES | (11) NUMERO 481.782 | (10) A1 |
| | (21) FECHA DE PRESENTACION 21-6-1979 | |

PATENTE DE INVENCION

Concedida el 27 de febrero de 1980
por el Ministerio de Industria y Energía
teniendo de la memoria de junta

| | | |
|---|--|--|
| (30) PRIORIDADES: | | |
| (31) NUMERO 917.961 | (32) FECHA 22-6-78 | (33) PAIS EE.UU. |
| (47) FECHA DE PUBLICIDAD | (51) CLASIFICACION INTERNACIONAL G01N 31/14 | (62) PATENTE DE LA QUE ES DERIVACIONARIA |
| (64) TITULO DE LA INVENCION "UN METODO DE ENSAYO DE FIJACION ESPECIFICO PARA DETERMINAR UN LIGANDO EN UN MEDIO LIQUIDO". | | |
| (71) SOLICITANTE (S) MILES LABORATORIES, INC. (USSN 917.961) | | |
| DOMICILIO DEL SOLICITANTE: 1127 Myrtle Street, Box 40, Elkhart, Indiana 46515, Estados Unidos de América. | | |
| (72) INVENTOR (ES) William Edward Hornby y David Lindsay Morris | | |
| (73) TITULAR (ES) | | |
| (74) REPRESENTANTE D. ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ (P-72.148) | | |

1

FUNDAMENTO DE LA INVENCION1. CAMPO DE LA INVENCION
- - - - -

5

10

Esta invención se refiere a métodos de ensayo, y medios reactivos para uso en ellos, del tipo de fijación específico homogéneo o heterogéneo para determinar cualitativa o cuantitativamente un ligando en un medio líquido. En particular, la invención se refiere a ensayos de fijación específicos que emplean marcadores que no son isótopos radiactivos. Adicionalmente, la invención se refiere a conjugados marcados con agentes distintos de los isótopos radiactivos para uso en tales ensayos y a métodos para su preparación.

15

20

25

2. DESCRIPCION DE LA TECNICA ANTERIOR

En las técnicas de los ensayos de fijación específicos convencionales, la muestra de ensayo se combina con medios reactivos de diversas composiciones que incluyen un conjugado que tiene un componente de marcado controlable y un componente de fijación que participa con otros constituyentes, en su caso, de los medios reactivos para formar un sistema de reacción de fijación que produce dos especies químicas o formas del conjugado marcado, una especie fijada y una especie libre. La cantidad o proporción relativa del conjugado marcado que da como resultado la especie química fijada comparada con la especie libre es función de la presencia (o cantidad) del ligando a detectar en la muestra de ensayo.

30

Como ilustración, se describirá a continuación una técnica de ensayo de fijación competitivo convencional. En una tal técnica, los medios reactivos comprenderían (1)

1 un conjugado marcado en la forma del ligando a detectar
(p. ej., un antígeno o hapteno), constituyendo tal ligando
el componente de fijación del conjugado, unido químicamen-
te a un componente de marcado, y (2) una pareja de fija-
5 ción específica para el ligando (p. ej., un anticuerpo).
Por combinación de la muestra de ensayo y los medios reac-
tivos, el ligando a detectar y el componente de fijación
del conjugado marcado competirían de una manera sustancial-
mente no discriminante para su fijación no covalente a la
10 pareja de fijación específica. Como resultado, o bien la
cantidad de conjugado marcado que podría llegar a quedar
fijada a la pareja de fijación (esto es, la que resulta
en la especie química fijada), o bien aquella cantidad que
podría permanecer libre (esto es, no fijada a la pareja
15 de fijación y por tanto la que resulta en la especie quí-
mica libre) puede medirse como función de la cantidad de
ligando competitivo presente. La cantidad de conjugado mar-
cado que da como resultado una cualquiera de las especies
químicas se determina por medición, esto es, comprobación,
20 del componente de marcado existente en ella.

Si el conjugado marcado contenido en la especie
química fijada y el que se encuentra en la especie química
libre son esencialmente indistinguibles por los medios uti-
lizados para controlar el componente de marcado, la espe-
25 cie química fijada y la especie química libre tienen que
separarse físicamente con objeto de completar el ensayo.
Se hace referencia en la técnica a este tipo de ensayo
como "heterogéneo". Si pueden distinguirse las formas de
las especies químicas fijada y libre del conjugado marcado,
30 puede seguirse un formato "homogéneo" y evitarse la etapa

1 de separación.

5 El primer tipo descubierto de ensayo de fijación específico altamente sensible fue el ensayo radioinmunológico que emplea un isótopo radiactivo como componente de marcado. Un tal ensayo tiene que seguir necesariamente el formato heterogéneo, dado que el carácter controlable del agente de marcado está inalterado cualitativamente en las especies químicas libre y fijada. A causa de la inconveniencia y la dificultad de la manipulación de los materiales radiactivos, se han ideado muchos nuevos sistemas de ensayo en que se utilizan materiales distintos de los isótopos radiactivos como componente de marcado, con inclusión de enzimas, moléculas fluorescentes, bacteriófagos, metales y complejos organometálicos, coenzimas, substratos de enzimas, inhibidores de enzimas, reactivos cíclicos, y reactivos quimioluminiscentes.

10

15

En lo que sigue se describen varios sistemas de reacción de fijación heterogéneos en los que se emplea una enzima como el componente de marcado: las Patentes de EE.UU. Núms. 3.654.090; 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; y 3.879.262; J. Immunol. Methods I:247 (1972); y J. Immunol. 109:129 (1972). Un ensayo de fijación heterogéneo en que se utiliza un precursor no activo de una sustancia espectrofotométricamente detectable como sustancia de marcado se sugiere en la Patente de EE.UU. Nº 3.880.934. De interés como antecedente adicional en lo que se refiere a ensayos heterogéneos es Principles of Competitive Protein-Binding Assays, edic. Odell y Daughaday (J.B.Lippincott Co., Filadelfia, 1972).

20

25

30 Un ensayo inmunológico marcado con enzima del

1 tipo homogéneo se describe en la Patente de EE.UU. Nº
3.817.834, en la que se emplea un conjugado ligando-enzima. La actividad enzimática del conjugado en la especie
5 química fijada es sensiblemente menor que la de la especie
libre, lo cual permite la utilización de un formato homogéneo. El uso de materiales particularmente excepcionales
como sustancias de marcado, con inclusión de coenzimas,
10 moléculas quimioluminiscentes, reactivos cíclicos, y substratos de enzimas fluorescentes escindibles, tanto en formatos homogéneos como heterogéneos, se describe en las
D.O.S. Núms. 2.618.419 y 2.618.511 basadas en las Solicitudes de Patente de EE.UU. Núms. de Serie 667.982 y 667.996,
presentadas el 18 de marzo de 1976, y cedidas a la presente
firma cesionaria.

15 Si bien la investigación para sustancias de marcado distintas de los isótopos radiactivos en los ensayos de fijación ha producido cierto número de soluciones de trabajo, sigue habiendo lugar para mejoras. Los enfoques de marcado con enzimas parecían ser al principio los más
20 prometedores, no obstante lo cual en la práctica han surgido varias dificultades. El elevado peso molecular y la naturaleza heteróloga de las enzimas crea problemas en lo referente a caracterizar, estabilizar, y preparar reproduciblemente los conjugados marcados. Estos problemas se
25 resolvieron reemplazando los agentes de marcado enzimáticos con agentes de marcado de peso molecular bajo controlables por su actividad reaccionante. Estos nuevos agentes de marcado, con inclusión de coenzimas, substratos de enzimas, reactivos cíclicos y reactivos quimioluminiscentes,
30 pueden utilizarse para realizar ensayos de alta sensibilidad.

1 - dad y versatilidad. Sin embargo, la detección de estos
agentes de marcado exige a menudo instrumentación que,
hasta el presente, no se encuentra disponible corriente-
mente en el laboratorio clínico.

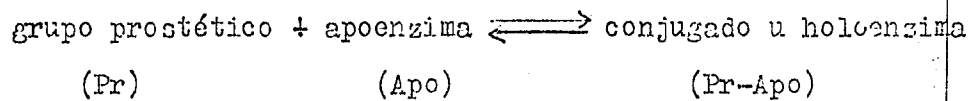
5 Es un objeto primario de la presente invención
proporcionar un ensayo de fijación en que no se utilizan
isótopos radiactivos que emplea un nuevo agente de marca-
do que es controlable con equipo típico de laboratorio
clínico mientras que se conservan las ventajas reactivo-
10 -agente de marcado consistentes en la sensibilidad, ver-
satilidad, y facilidad de síntesis y caracterización de
los conjugados marcados.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

15 Se ha encontrado ahora que se proporciona un
ensayo de fijación específico mejorado por el empleo de
un resto de grupo prostético orgánico como componente de
marcado en el conjugado de marcado. Los grupos prostéticos
son una clase de cofactores de enzimas reconocida en la
técnica. Un cofactor de enzima es una sustancia no proteí-
20 nica cuya presencia se requiere para que una enzima exhiba
su actividad catalítica y que sufre un cambio químico du-
rante el ciclo catalítico de la enzima de que se trate
(a la que se hace referencia como la enzima madre). Una
coenzima es un tipo de cofactor de enzima que se modifica
25 químicamente en el curso de la reacción catalizada por la
enzima madre. La regeneración de la forma original del
cofactor requiere su participación en una reacción separa-
da que es catalizada por una enzima diferente de la enzima
madre. En contraste, un grupo prostético es un cofactor
30 de enzima que se modifica químicamente en el curso de la

1 reacción catalizada por la enzima madre y se regenera, esto
 es, se reconvierte en su forma original, por una segunda
 reacción catalizada por la misma enzima madre.

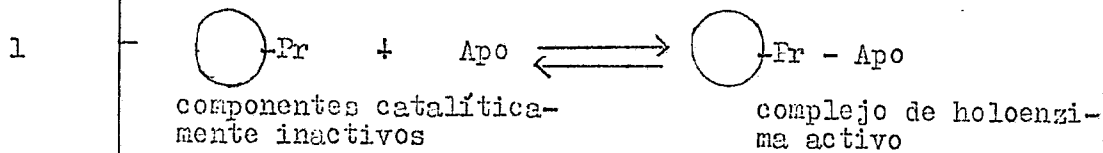
5 Los grupos prostéticos se caracterizan usualmen-
 te por estar firmemente unidos en términos relativos a la
 porción proteínica de la enzima madre, conociéndose tal
 porción proteínica como la apoenzima y conociéndose la
 enzima madre catalíticamente activa como la holoenzima. La
 reacción de equilibrio para la interacción entre un grupo
 10 prostético y una apoenzima se puede representar como sigue:



15 Tal como se utiliza en esta memoria, el término
 enzima conjugada hace referencia al complejo formado por
 combinación del grupo prostético y la apoenzima, exhiba
 o no tal complejo actividad catalítica, y el término holo-
 enzima se refiere sólo a una enzima conjugada catalítica-
 mente activa. Información adicional concerniente a grupos
 prostéticos, sus características, y sus interacciones con
 20 apoenzimas pueden obtenerse haciendo referencia a Dixon
 y Webb, Enzymes, 1ª edic., Longmans, Green & Co. (Londres,
 1958).

25 En la presente invención, un grupo prostético
 orgánico está copulado con un componente de fijación para
 formar un conjugado marcado para uso en ensayos de fija-
 ción. Una característica central de la invención es la
 interacción resultante entre el grupo prostético conjuga-
 do y la apoenzima, ilustrada como sigue:

30



5 Si bien la reacción arriba representada es la interacción observada normalmente, se anticipa que en ciertas circunstancias el complejo de enzima conjugada exhibirá poca o ninguna actividad como holoenzima, por ejemplo en el caso en que la conjugación del grupo prostético impide la interacción normal holoenzima-substrato. No obstante, pueden

10 resultar conjugados marcados de uso en la presente invención si, después de la fijación del componente de fijación (representado por el símbolo O arriba) del grupo prostético conjugado en la reacción de fijación del ensayo, el complejo de enzima conjugada fijada exhibe entonces realmente actividad de holoenzima, tal como sucede en el caso

15 de que tal fijación atenúe la inhibición de la interacción holoenzima-substrato.

Existen numerosos esquemas posibles de control de los agentes de marcado, algunos de los cuales se ilustran más adelante en esta memoria, siguiendo cualquiera de los diversos formatos de fijación conocidos homogéneos y heterogéneos. Sin embargo, en todos los casos el componente de marcado del conjugado marcado que participa en la reacción de fijación comprende un resto de grupo prostético orgánico y el esquema de control comprende determinar el componente de marcado en la especie química fijada o en la especie libre, o en ambas, según cuál sea el caso, sobre la base de la determinación de la actividad de holoenzima.

30

Los restos de grupos prostéticos que se utilizan

1 preferiblemente en la presente invención son restos de
flavina-adenina-dinucleótido, flavina-mononucleótido, y
hem. Pares preferibles de resto de grupo prostético/apoen-
zima son restos de flavina-adenina-dinucleótido/apoglucosa-
5 -oxidasa y restos de hem/apoperoxidasa. Las respectivas
holoenzimas formadas a partir de tales pares se detectan
fácilmente con las bien conocidas técnicas de determina-
ción de peróxido de hidrógeno que incluyen métodos colori-
métricos y fluorométricos. Debido a la naturaleza catalíti-
10 ca de la holoenzima controlada, la presencia del componen-
te de marcado se amplifica muchas veces en la reacción de
detección, permitiendo una detección sumamente sensible
del ligando objeto del ensayo (p.ej. en niveles de ng/ml),
empleando instrumentación relativamente poco sensible pero
15 fácilmente asequible y sencilla, tal como espectrofotóme-
tros. La combinación de la posibilidad de usar una molécu-
la de grupo prostético de peso molecular bajo como el com-
ponente a través del cual se copula el componente de mar-
cado al componente de fijación en el conjugado marcado, y
20 la posibilidad de alcanzar una detección altamente sensi-
ble con lectura espectrofotométrica, particularmente colo-
rimétrica, proporciona un ensayo de fijación específica
excepcionalmente ventajoso.

25 El presente ensayo se caracteriza por límites
de detección altamente sensibles, por ser fácilmente adap-
table a la automatización, por permitir que el agente de
marcado se detecte con instrumentación que se encuentra
corrientemente disponible en los laboratorios clínicos,
y por utilizar conjugados marcados que pueden sintetizarse
30 de modo reproducible y relativamente sencillo.

1

DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

En el contexto de esta descripción, los términos siguientes se definirán como sigue, a no ser que se indique otra cosa: "ligando" es la sustancia, o clase de sustancias afines, cuya presencia o la cantidad de ella(s) en un medio líquido debe determinarse; "pareja de fijación específica del ligando" es cualquier sustancia, o clase de sustancias, que tiene una afinidad de fijación específica para el ligando con exclusión de otras sustancias; "análogo de fijación específica del ligando" es cualquier sustancia, o clase de sustancias, que se comporta esencialmente lo mismo que el ligando con respecto a la afinidad de fijación de la pareja de fijación específica para el ligando; "residuo" es un resto en una molécula orgánica, por ejemplo, un residuo de grupo prostético es un resto orgánico en tal conjugado derivado de y que funciona esencialmente como un grupo prostético, tal como el grupo prostético menos un átomo de hidrógeno en una posición a través de la cual el grupo prostético está copulado con la porción remanente del conjugado marcado (en un conjugado marcado FAD-ligando, FAD representa un resto del grupo prostético flavina-adenina-dinucleótido); "medio reactivo" es una composición, dispositivo o equipo de ensayo que comprende los reactivos utilizados para realizar un método de ensayo; "reacción de detección" es la reacción en la que se determina el componente de marcado del conjugado marcado por medición de la actividad de holoenzima; "alcohol inferior" es un grupo alcohol de cadena recta o ramificada que comprende de 1 a 6 átomos de carbono inclusive, tal como metilo, etilo, isopropilo, y hexilo.

30

1 El ensayo presente se puede aplicar a la detec-
ción de cualquier ligando para el cual exista una pareja
de fijación específica. El ligando es usualmente un pépti-
do, proteína, hidrato de carbono, glicoproteína, esteroide,
5 u otra molécula orgánica para la cual existe una pareja de
fijación específica en sistemas biológicos o puede sinteti-
zarse. El ligando, en términos funcionales, se selecciona
usualmente del grupo constituido por antígenos y anticuer-
pos del mismo; haptenos y anticuerpos del mismo; y hormonas,
10 vitaminas, metabolitos y agentes farmacológicos, y sus re-
ceptores y sustancias de fijación. Ejemplos específicos de
ligandos que pueden detectarse utilizando la presente in-
vención son hormonas tales como insulina, gonadotropina
coriónica, hormonas del tiroides, y estriol; antígenos y
15 haptenos tales como ferritina, bradiquinina, prostaglandi-
nas, y antígenos específicos de tumores; vitaminas tales
como biotina, vitamina B₁₂, ácido fólico, vitamina E, vi-
tamina A, y ácido ascórbico; metabolitos tales como 3',5'-
-adenosin-monofosfato y 3',5'-guanosin-monofosfato; agen-
20 tes farmacológicos o drogas, tales como anticonvulsivos,
broncodilatadores, agentes cardiovasculares, y drogas de
abuso; anticuerpos tales como anticuerpo microsómico y an-
ticuerpos de la hepatitis y alérgenos; y receptores de fi-
jación específicos tales como globulina de fijación de ti-
25 roxina, avidina, factor intrínseco, y transcobalamina. El
presente ensayo es particularmente útil para la detección
de haptenos, y análogos de los mismos, de peso molecular
comprendido entre 100 y 1000, particularmente las hormonas
de yodotironina del tiroides tiroxina y liotironina.

30

El medio líquido a ensayar puede ser un líquido

1 existente en estado natural o formado artificialmente que
 se sospeche contenga el ligando, y usualmente es un fluido
 biológico o un líquido resultante de una dilución u otro
 tratamiento del mismo. Fluidos biológicos que pueden en-
 5 sayarse, siguiendo el método presente incluyen suero, plas-
 ma, orina, saliva, y los fluidos amniótico y cerebroespinal.
 Otros materiales tales como materia sólida, por ejemplo te-
 jidos, pueden ensayarse reduciéndolos a una forma líquida,
 tal como por disolución del sólido en un líquido o por ex-
 10 tracción del sólido con un líquido.

CONJUGADO MARCADO

El conjugado marcado de la presente invención
 comprende un resto de grupo prostético orgánico en su com-
 ponente de marcado y puede estar en cualquiera de dos for-
 15 mas básicas representadas esquemáticamente como sigue:

| <u>Fórmula esquemática</u> | <u>Componente de marcado</u> |
|----------------------------|---|
| Pr-R-L | Resto de grupo prostético (Pr-) |
| Apo-Pr-R-L | Holoenzima o resto de enzima conjugada (Apo-Pr-) |

20 donde Pr representa el resto de grupo prostético y Apo la
 apoenzima, R es un grupo de enlace, y L es el componente
 de fijación del conjugado marcado, usualmente el ligando
 o un análogo de fijación del mismo. Usualmente, el compo-
 nente de fijación y el resto de grupo prostético están co-
 25 pulados a través del grupo de enlace en un punto del prime-
 ro alejado de su lugar de fijación específica (esto es, la
 localización del componente de fijación que participa en
 la reacción de fijación del ensayo, tal como un punto de
 fijación inmunoquímica en el que el componente de fija-
 30 ción es un antígeno, hapteno o anticuerpo del mismo) y en

1 un punto del último alejado de su punto de fijación activo para la apoenzima.

MÉTODOS DE ENSAYO

5 Hay diversos métodos disponibles para la detección de los nuevos conjugados marcados de acuerdo con la presente invención. En cada caso, el resto de grupo prostético está copulado covalentemente con el componente de fijación en el componente marcado, y la reacción de detección comprende medir actividad de holoenzima en la especie 10 química fijada o la especie química libre, o ambas, según cuál sea el caso.

Para propósitos de ilustración exclusivamente, a continuación se dan ejemplos de varios esquemas de detección basados en técnicas de fijación competitivas homogéneas y heterogéneas, siendo así que se entenderá que pueden 15 seguirse en la práctica otras técnicas homogéneas y heterogéneas.

En las ilustraciones que siguen, se utilizarán las abreviaturas siguientes compatibles con el resto de la descripción de esta memoria:

| | <u>Término</u> | <u>Abreviatura</u> |
|----|------------------------------|--|
| | Resto de grupo prostético | Pr |
| | Apoenzima | Apo |
| | Grupo de enlace | R |
| 25 | Ligando | L |
| | Pareja de fijación | B |
| | Resto de enzima conjugada | Apo-Pr |
| | Resto de holoenzima (activo) | Apo-Pr |

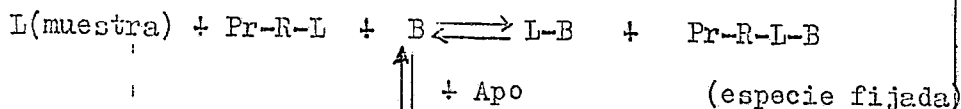
Esquema de Detección Ilustrativo N.º 1

30

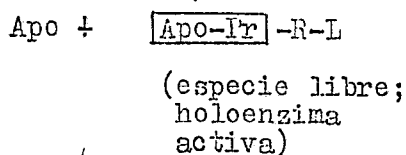
Método de Fijación Competitiva Homogénea - Apo-

27079

1 - enzima introducida después de la iniciación de la reacción de fijación



5



10 En este esquema, el resto de grupo prostético como componente de marcado se detecta por adición de apoenzima de un modo sustancialmente simultáneo con o después de la iniciación de la reacción de fijación, esto es, durante la reacción de fijación o después que la reacción de fijación ha alcanzado el equilibrio, y determinación de la actividad de holoenzima en la mezcla de reacción final. El ensayo es homogéneo por selección de condiciones tales que la fijación de apoenzima con el resto de grupo prostético se inhibe para el grupo prostético en la especie fijada. Ahora bien, podrían seleccionarse condiciones tales que la apoenzima pueda fijarse a la forma de especie química fijada del conjugado marcado, pero el complejo de enzima conjugada resultante no exhibe actividad enzimática alguna, por ejemplo a causa de la inhibición de la interacción enzima-substrato (esta situación no se representa en el esquema anterior). En cualquier caso, la cantidad total de actividad enzimática medida en el sistema es el resultado de la fijación no inhibida de la apoenzima al conjugado marcado y, de acuerdo con ello, es una función directa de la cantidad de ligando existente en la muestra disponible para competencia con respecto a la fijación a la pareja de fi-

15

20

25

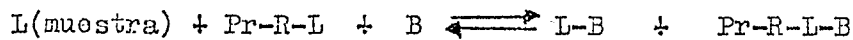
30

1 jación.

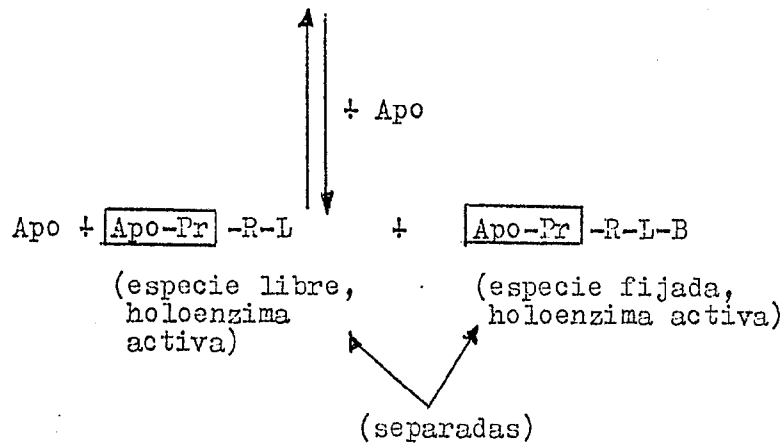
Podría ocurrir también (pero tampoco se muestra arriba) que, en contraste con los esquemas anteriores, el conjugado marcado (Pr-R-L) se forme de tal modo que la fijación con la apoenzima se inhiba pero que como resultado de la fijación del conjugado marcado por la pareja de fijación tal inhibición se atenúe y la apoenzima sea capaz de fijarse con la forma de especie química fijada del conjugado marcado para formar un complejo de holoenzima activo. En un tal caso, la cantidad de actividad de holoenzima resultante en el sistema es una función inversa de la cantidad de ligando presente en la muestra.

Esquema de Detección Ilustrativo Nº 2

Método de Fijación Competitiva Heterogénea - Apoenzima introducida después de la iniciación de la reacción de fijación.



20



25

Este esquema implica los mismos reactivos y el mismo orden de adición que el esquema nº 1 arriba descrito, excepto que las condiciones son tales que la apoenzima se puede fijar al conjugado marcado en la especie química fijada para formar un complejo de holoenzima activa cualitativamente indi-

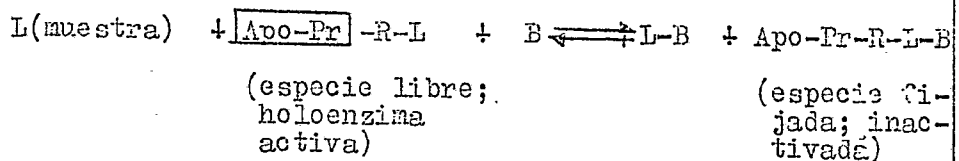
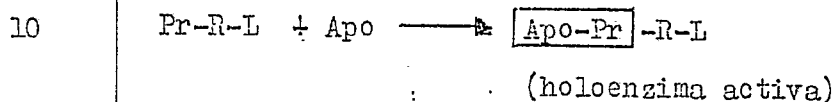
30

27079

1 - ferenciable del formado por fijación a la forma de especie
 química libre del conjugado marcado. La especie fijada y
 la especie libre tienen que separarse y la actividad de
 enzima en una de ellas es función de la cantidad de ligan-
 5 do presente en la muestra.

Esquema de Detección Ilustrativo N° 3

Método de Fijación Competitiva Homogénea - Apo-
 enzima introducida antes de la iniciación de la reacción
 de fijación.



En este esquema, el resto de grupo prostético está compren-
 dido en el componente de marcado por estar copulado al li-
 gando y combinado con la apoenzima en la forma de un pro-
 ducto de holoenzima activa. El resto de grupo prostético
 20 se detecta por determinación de la actividad de holoenzima
 en la mezcla de reacción final. El ensayo es homogéneo por
 selección de condiciones tales que como resultado de la
 fijación de la pareja de fijación al complejo de holoenzi-
 ma activa la forma de especie química fijada que resulta
 25 exhibe actividad de enzima inhibida por ejemplo por causa
 de la inhibición de la interacción enzima-substrato. La
 cantidad total de actividad de enzima medida en el sistema
 es el resultado del complejo de holoenzima activa no fija-
 da, es decir, la forma de especie química libre, y de acuer-
 30 do con ello es función directa de la cantidad de ligando

1

presente en la muestra.

5

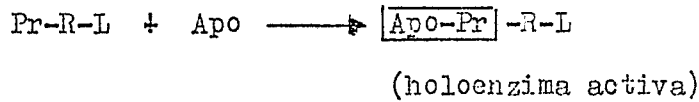
Podría ocurrir también (pero no se muestra arriba) que, en contraste con el esquema anterior, el conjugado marcado exhiba poca o ninguna actividad enzimática, pero que como resultado de la fijación de la pareja de fijación la forma de especie química fijada exhiba realmente una actividad enzimática apreciable o aumentada. En tal caso, la cantidad de actividad de holoenzima resultante en el sistema es función inversa de la cantidad de ligando presente en la muestra.

10

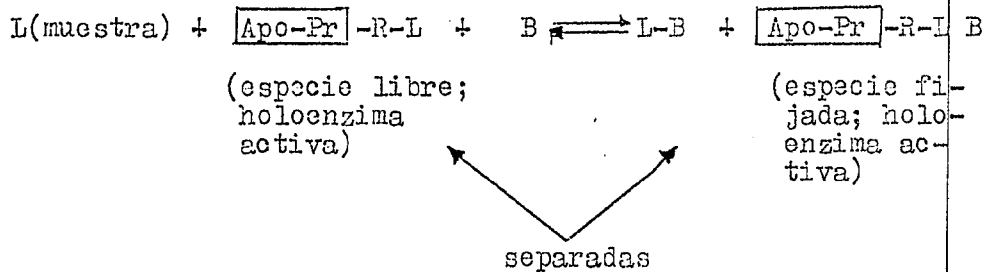
Esquema de Detección Ilustrativo N° 4

Método de Fijación Competitiva Heterogénea - Apoenzima introducida antes de la iniciación de la reacción de fijación.

15



20



25

Este esquema implica los mismos reactivos y el mismo orden de adición que el esquema N° 3 arriba descrito excepto que las condiciones son tales que tanto la especie química fijada como la especie libre son enzimáticamente activas y son cualitativamente indiferenciables. La especie química fijada y la especie libre tienen que separarse, y la actividad de enzima en una de ellas es función de la cantidad de ligando presente en la muestra.

30

1 Los esquemas Nº 3 y Nº 4 son esencialmente en-
sayos marcados con enzimas excepto que, en contraste con
la técnica anterior, la enzima como tal está copulada con
el componente de fijación del conjugado marcado a través
5 de un resto de grupo prostético. A este respecto, por con-
siguiente, la presente invención proporciona un nuevo mé-
todo de preparación de un conjugado marcado con enzima que
comprende las etapas de (a) copular covalentemente el res-
to del componente de fijación (esto es, el ligando a de-
10 tectar o un análogo de fijación o pareja del mismo) a un
grupo prostético orgánico que es capaz de combinarse con
una apoenzima para producir una enzima conjugada, p. ej.,
una holoenzima activa, (b) combinar el conjugado marcado
del grupo prostético resultante con la apoenzima, y (c)
15 aislar el conjugado marcado con enzima conjugada resultan-
te. Se considera que un tal método es sumamente valioso en
la preparación de conjugados marcados con enzimas para uso
en ensayos debido a la manera controlada en la que el gru-
po prostético de peso molecular bajo y bien caracterizado
20 puede copularse con el componente de fijación.

Es evidente, por la discusión que antecede, que
para ciertos conjugados marcados y ciertos pares ligando/
pareja de fijación serán apropiados uno o más de los es-
quemas homogéneos descritos dependiendo de varios facto-
res, con inclusión de la aptitud de la apoenzima para fi-
25 jarse a la forma de especie química fijada del conjugado
marcado y el efecto de la pareja de fijación que se fija
al complejo de enzima conjugada. En los casos en que las
formas de especie química libre y especie fijada del con-
jugado marcado exhiben actividad indiferenciable, puede
30

1 - seguirse un formato heterogéneo para proporcionar un en-
sayo útil. De acuerdo con ello, si bien las circunstan-
cias pueden dictar qué esquema o esquemas manipulativos
particulares será(n) el(los) más útil(es), el presente
5 método de ensayo, en general, es adaptable a cualquier
técnica convencional homogénea o heterogénea.

Técnicas Homogéneas.

Una técnica homogénea, esto es, una que no re-
quiere una separación física de la especie fijada y la
10 especie libre, es utilizable en los casos en que la reac-
ción entre el componente de fijación del conjugado marca-
do y una pareja de fijación correspondiente causa un cam-
bio apreciable, bien sea en un sentido positivo o negati-
vo, en la aptitud del componente de marcado del conjugado
15 marcado para participar en la reacción de detección, p.
ej., en la aptitud del conjugado marcado para combinarse
con la apoenzima y/o exhibir actividad de holoenzima. En
un tal caso, la distribución del componente de marcado
entre la especie fijada y la especie libre puede determi-
20 narse sin separación de las especies. La actividad de holo-
enzima en la mezcla de reacción se determina después pro-
duciendo en al menos una porción de la misma la reacción
química catalizada por tal holoenzima. p.ej., por adición
de substrato, y medición por cualquier técnica convencional
25 de la velocidad o cantidad agregada de producción de pro-
ducto o consumo de reactivos. La determinación cualitativa
del ligando en el medio líquido implica comparar la canti-
dad medida con la de la reacción de detección en un medio
líquido desprovisto del ligando, siendo cualquier diferen-
30 cia entre ellas una indicación de la presencia de tal li-

gando en el líquido ensayado. La determinación cuantitativa del ligando en el medio líquido implica comparar la cantidad medida con la de la reacción de detección en medios líquidos que contienen diversas cantidades conocidas del ligando, p. ej., una comparación con una curva típica.

En general, cuando se sigue una técnica de ensayo homogénea, los componentes de la reacción de fijación específica, esto es, el medio líquido que se sospecha puede contener el ligando, el conjugado marcado, y, en algunos sistemas (esto es, un sistema de fijación competitivo), una pareja de fijación específica del ligando, pueden combinarse en cualquier cantidad, de cualquier manera, y en cualquier secuencia, con tal que la actividad del componente de marcado del conjugado marcado se altere apreciablemente cuando el medio líquido contiene el ligando en una cantidad o concentración de importancia para los propósitos del ensayo. Preferiblemente, todos los componentes de la reacción de fijación específica son solubles en el medio líquido.

Las variaciones conocidas de los métodos homogéneos brevemente descritos arriba y detalles adicionales concernientes a las técnicas específicas consideradas, con inclusión de una técnica alternativa conocida como la técnica de fijación directa, son fácilmente asequibles en la bibliografía, p. ej. OLS alemana Nº 2.618.511, correspondiente a la Solicitud de Patente de los EE.UU. Nº de Serie 667.996, presentada el 18 de marzo de 1976 y cedida a la presente firma cesionaria.

Técnicas Heterogéneas

El uso de los presentes nuevos agentes de mar-

1 cado puede aplicarse también a las técnicas convencionales
de ensayo de tipo heterogéneo en las que las especies fi-
jada y libre del conjugado marcado se separan y se deter-
mina el componente de marcado en una o la otra. El medio
5 reactivo para la realización de un tal ensayo heterogéneo
puede tomar muchas formas diferentes. En general, tal me-
dio comprende tres constituyentes básicos, que son (1) el
ligando a detectar, (2) una pareja de fijación específica
del ligando, y (3) el conjugado marcado. Los constituyentes
10 de la reacción de fijación se combinan simultáneamente o
en una serie de adiciones, y con un período o períodos de
incubación apropiados, el conjugado marcado llega a fijar-
se con sus correspondientes parejas de fijación de tal mo-
do que la extensión de la fijación, esto es, la relación
15 de la cantidad de conjugado marcado fijada a una pareja
de fijación (la especie fijada) a la cantidad no fijada
(la especie libre), es función de la cantidad de ligando
presente. Las especies fijada y libre se separan física-
mente y la cantidad de agente de marcado presente en una
de ellas se determina por medición de la actividad de ho-
20 loenzima en ella y comparación de la misma con los resul-
tados de un testigo negativo o patrones, p. ej., una cur-
va típica.

Diversos medios de realización de la etapa de
25 separación y de formación de los sistemas de reacción de
fijación están asequibles en la técnica. La separación
puede implicar técnicas convencionales tales como aquéllas
en las que se utiliza lo que se conoce corrientemente co-
mo un anticuerpo o antígeno en fase sólida, un segundo
anticuerpo, o un segundo anticuerpo en fase sólida, así
30

1 como el uso de agentes de precipitación complejos inmunes
y adsorbentes, etcétera. Los sistemas de reacción de fi-
jación que pueden seguirse incluyen la denominada técnica
de fijación competitiva, la técnica de saturación secuen-
5 cial, la técnica "de emparedado", etcétera. Detalles ul-
teriores concernientes a los diversos sistemas heterogéneos
conocidos están asequibles fácilmente en la bibliografía,
p. ej. OLS alemana Nº 2.618.419, correspondiente a la So-
licitud de Patente de los EE.UU. Nº de Serie 667.982, pre-
10 sentada el 18 de marzo de 1976 y cedida a la presente fir-
ma cesionaria.

Debe reconocerse que pueden idearse técnicas ma-
nipulativas que impliquen otros órdenes de adición y otros
formatos de reacción de fijación para la realización de
15 ensayos de fijación específica homogéneos y heterogéneos
sin apartarse del concepto de inventiva materializado en
esta memoria.

GRUPO PROSTÉTICO

20 Como se ha indicado previamente, los grupos pros-
téticos son una clase distinta reconocida en la técnica de
cofactores de enzimas que se caracteriza principalmente
por su aptitud para ser regenerado a la forma de cofactor
activa por la apoenzima madre. La presente invención emplea
25 grupos prostéticos orgánicos que pueden copularse química-
mente con el componente de fijación en el conjugado marca-
do. Usualmente, la constante de fijación para la asociación
de la apoenzima y el grupo prostético cuyo resto está com-
prendido en el conjugado marcado de la presente invención
es mayor que aproximadamente 10^6 molar⁻¹, y preferiblemen-
30 te es mayor que 10^8 molar⁻¹. La afinidad de fijación real

1 del resto de grupo prostético que aparece en el conjugado
marcado puede verse disminuida de la correspondiente al
grupo prostético libre en un pequeño porcentaje o en tan-
to como dos órdenes de magnitud sin afectar a la utilidad
5 de tal resto de grupo prostético como componente de mar-
cado en un ensayo de fijación.

A continuación se da una tabla que contiene va-
rios grupos prostéticos útiles en la presente invención,
la enzima conjugada producida por combinación con apcenzi-
10 ma, y las constantes de fijación para la asociación del
grupo prostético y la apoenzima:

27079

| <u>Grupo prostético</u> | <u>Enzima conjugada</u> | <u>Constante de fijación</u> (molar ⁻¹) | <u>Referencia</u> |
|--|---|--|-------------------|
| flavina-adenina- dinucleótido (FAD) | glutathion-reductasa (eritrocitos humanos) | 2 x 10 ⁶ | 1,3 |
| flavina-mono- nucleótido (FMN) | citocromo-reductasa (levadura) | 10 ⁹ | 2 |
| FMN | NADPH: oxidorreductasa ("enzima amarillo viejo") | 3 x 10 ⁷ | 2 |
| FAD | glucosa-oxidasa (Aspergillus niger) | > 10 ⁹ | 4 |
| FAD | lipoamida-deshidrogenasa | 4 x 10 ⁶ | 5 |
| FMN | piridoxin-fosfato-oxidasa | 5 x 10 ⁷ | 6 |
| hem | peroxidasa (de rábano picante) | > 10 ⁹ | 7 |
| hem | citocromo C | > 10 ⁹ | 8 |

- 1 Scott y otros, J. Biol. Chem. 238:3928 (1963).
- 2 Haas y otros, J. Biol. Chem. 143:341 (1942).
- 3 Staal y otros, Biochim. Biophys. Acta 185:39 (1969).
- 4 Swoboda, Biochim. Biophys. Acta 175:365 (1969).
- 5 Visser y Veeger, Biochim. Biophys. Acta 206:224 (1970).
- 6 Arsenis y McCormick, J. Biol. Chem. 241:330 (1966).
- 7 Theorell y otros, Arkiv. Kemi. Min. O. Geol. 148:1 (1940).
- 8 Yonetani, J. Biol. Chem. 242:5008 (1967).

10 Un par preferido grupo prostético/apoenzima es hem y apoperoxidasa, y uno particularmente preferido es flavina-adenina-dinucleótido y aproglucosa-oxidasa. Tales grupos prostéticos proporcionan medios rápidos para unión a ligandos, análogos de ligandos y parejas de fijación, y las holoenzimas resultantes participan en reacciones de
15 detección de peróxido de hidrógeno que son bien conocidas y utilizadas analíticamente y que pueden seleccionarse para generar respuestas colorimétricas que son ventajosas para el técnico del laboratorio clínico.

20 Debe tenerse en cuenta que un cofactor particular puede comportarse como una coenzima o un grupo prostético dependiendo del sistema de enzima en el que se encuentra (p. ej., FAD); sin embargo, la presente invención considera el uso de un tal cofactor solamente en asociación con un sistema de enzima en el que aquél se comporta
25 como un grupo prostético como se define anteriormente en esta memoria.

GRUPO DE ENLACE

30 Se comprenderá que hay muchos métodos utilizables para enlazar el componente de fijación del conjugado

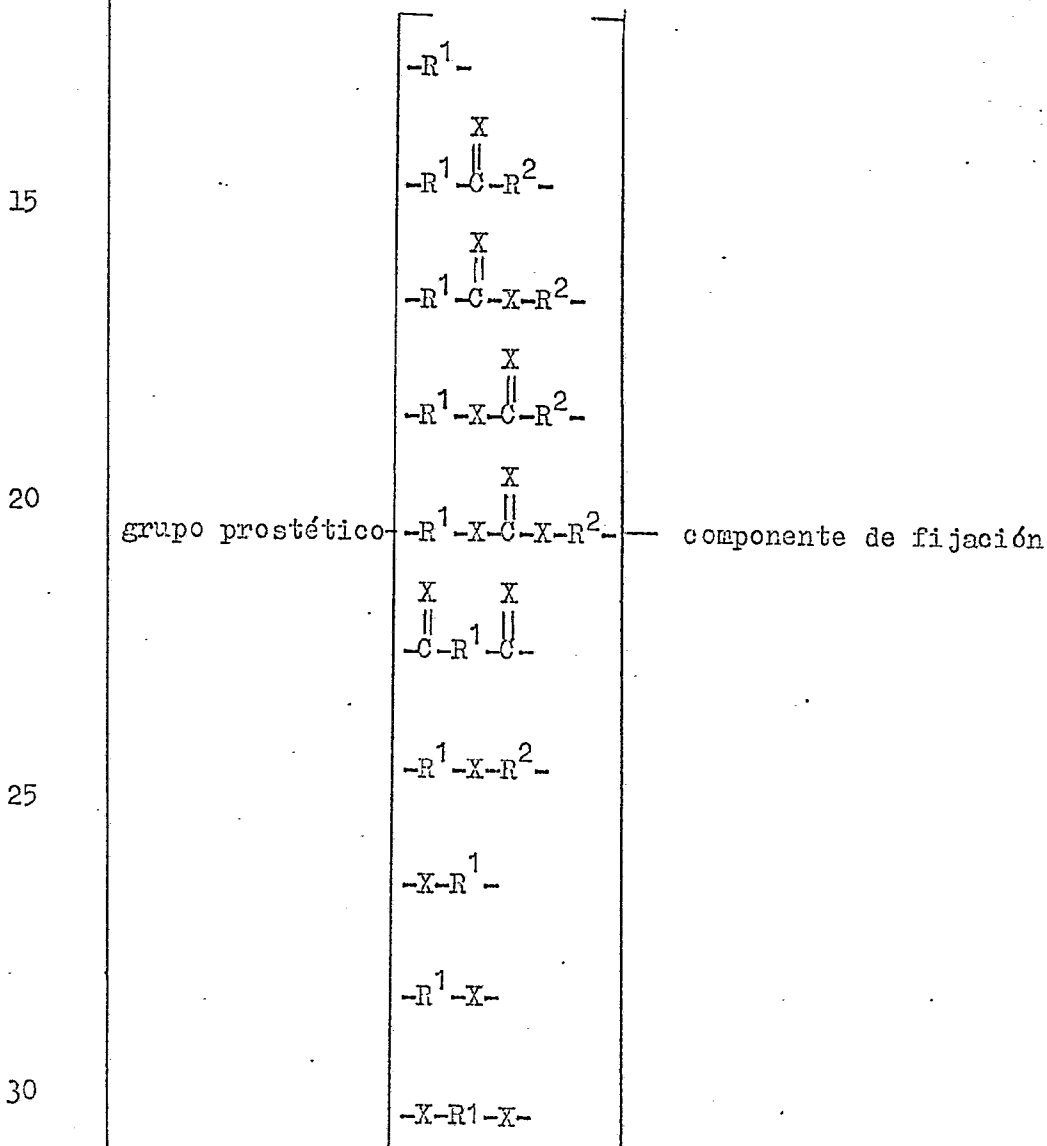
1 marcado, p. ej., el ligando a detectar, un análogo de fijación del mismo, o una pareja de fijación de aquél, al grupo prostético. El carácter químico particular del grupo de enlace dependerá de la naturaleza de los puntos de enlace disponibles respectivos en el componente de fijación y el grupo prostético. Las consideraciones importantes en la selección de los puntos de enlace son usualmente (1) la preservación de la aptitud del componente de fijación enlazado para participar eficazmente en el sistema de ensayo de fijación seleccionado y (2) la preservación de la aptitud del resto del grupo prostético enlazado para combinarse con la apoenzima (o la inhibición de tal aptitud de fijación cuando la misma pueda atenuarse como resultado de la fijación del conjugado marcado por una pareja de fijación -véase el esquema de detección ilustrativo nº 1), en ambos casos, en la extensión de que resulte un ensayo útil para el ligando particular que se ensaya y para las concentraciones o cantidades particulares en las que tal ligando debe detectarse. Usualmente, el grupo de enlace comprenderá un enlace químico, usualmente un enlace simple, pero algunas veces un enlace doble, o una cadena que contenga entre 1 y 14, más corrientemente entre 1 y 6, átomos de carbono y entre 0 y 5, más comúnmente entre 1 y 3, heteroátomos seleccionados de entre nitrógeno, oxígeno, y azufre.

Tanto el grupo prostético como el componente de fijación, por supuesto, ofrecerán una gran diversidad de funcionalidades para la unión del grupo de enlace. Comúnmente, las funcionalidades que puede esperarse estén disponibles para el grupo de enlace son amino, usualmente

1 amino primario; hidroxilo; halógeno, usualmente cloro o
bromo; ácido carboxílico; aldehido; cetona; isotiociana-
to; isocianato; etcétera. De acuerdo con ello, la estruc-
tura química del grupo de enlace propiamente dicho varia-
5 rá ampliamente, dependiendo sus grupos terminales de las
funcionalidades disponibles en el grupo prostético y el
componente de fijación, y siendo su longitud total una
cuestión de elección dentro de las limitaciones básicas
de mantener los caracteres esenciales del grupo prostéti-
10 co y el componente de fijación del conjugado resultante.
Con relación a la longitud del grupo de enlace en la pre-
paración de un conjugado para uso en un formato de ensayo
homogéneo, usualmente es deseable utilizar un grupo lo
más corto posible sin dar lugar a que el componente de fi-
15 jación resultante en el conjugado interfiera significati-
vamente con la actividad del grupo prostético del conju-
gado. En los casos en que el componente de fijación tiene
un peso molecular bajo (p. ej., un hapteno de peso mole-
cular comprendido entre 100 y 1000), el grupo de enlace
20 es preferiblemente un enlace químico o una cadena de 1 a
6 átomos tal como un alcohol inferior, carbonilo, alco-
hilcarbonilo, amido, alcoholamido, y análogos. En otras
circunstancias, tal como cuando el componente de fijación
en el conjugado es de peso molecular relativamente mayor,
25 tal como un polipéptido o proteína (p. ej., un anticuerpo),
es usualmente deseable un grupo de enlace más largo para
evitar el impedimento estérico del punto de combinación
de la apoenzima del conjugado. En estos casos, el grupo
de enlace comprenderá usualmente 1 a 14 átomos de carbono
y 0 a 5 heteroátomos como se ha considerado previamente.

1 Cadenas de cualquier longitud significativamente mayor
 dan algunas veces como resultado conjugados en los que el
 componente de fijación tenderá a plegarse hacia atrás en
 el punto de combinación de la apoenzima. Teniendo presen-
 5 tes estas consideraciones, se muestran en la Tabla 1 si-
 guiente ejemplos de grupos de enlace. Ejemplos particula-
 res de grupos de enlace se verán más adelante en esta me-
 moria, y variaciones adicionales se admitirán fácilmente
 como pertenecientes al estado de la técnica.

TABLA 1

grupo de enlace

1 - donde X es amino, azufre o, preferiblemente, oxígeno; y R¹
y R² son, independientemente, un alcoholeno inferior que
tiene 1-6 átomos de carbono, tal como metileno, etileno,
isopropileno, butileno o hexileno.

5 APOENZIMA

La apoenzima, o porción proteínica de la holoenzima desprovista del grupo prostético, se prepara por disociación de la enzima conjugada y aislamiento de la proteína de la apoenzima liberada. La disociación de la enzima conjugada puede realizarse en una diversidad de maneras conocidas tales como por introducción de la enzima en una solución fuertemente ácida, p. ej., de pH menor que 2. Análogamente, la recuperación de la apoenzima puede realizarse por una diversidad de técnicas conocidas, que incluyen precipitación selectiva de la proteína o adsorción selectiva del grupo prostético liberado de peso molecular bajo.

Como se ha indicado previamente, la apoperoxidasa y la apoglucosa-oxidasa son apoenzimas particularmente preferidos para uso en la presente invención debido a que sus holoenzimas participan en reacciones de peróxido de hidrógeno analíticamente ventajosas. De ello se sigue que otras enzimas conjugadas afines, particularmente las oxidorreductasas, que catalizan reacciones que producen peróxido de hidrógeno y que pueden disociarse para dar una apoenzima inactiva encontrarán aplicación particular en la presente invención. Existen métodos publicados de aislamiento de apoenzimas, particularmente para apoglucosa-oxidasa, Biochim. Biophys. Acta 175:365 (1969) y para apoperoxidasa, J. Biol. Chem. 206:109 (1953) y Arkiv.Kemi. Min. O. Geol. 148:1 (1940).

1 En el caso de que surja la posibilidad de inter-
ferencia en el ensayo debida a la presencia de grupo pros-
tético endógeno en la muestra o en cualquiera de los reac-
tivos o debida a la contaminación con grupo prostético del
5 equipo de laboratorio, material de vidrio o material de
plástico, tal grupo prostético causante de interferencia
puede eliminarse fácilmente por técnicas de inactivación
disponibles. Por ejemplo, la interferencia de FAD puede
eliminarse por tratamiento secuencial con soluciones de
10 peryodato y etilenglicol, o por el uso de otras técnicas
de inactivación de FAD. A continuación se ilustrará la pre-
sente invención por los ejemplos siguientes, pero no se tie-
ne la intención de que los mismos sean limitantes del al-
cance de aquélla.

15 EJEMPLO 1

Ensayos de Fijación Homogénea para N-2',4'-dinitrofenil-6- -aminocaproato

A. Preparación del conjugado marcado -N⁶-(6-aminohexil)-dini-
trofenil-flavina-adenina-dinucleótido.

20 Flavina-N⁶-aminohexil-adenina-dinucleótido.

Se sintetizó N⁶-trifluoroacetamidohexil-adenosina-
-5'-monofosfato por el método de Trayer y otros, Biochem.
J. 139:609(1974).

25 Se disolvieron 56 miligramos (mg) de N⁶-trifluoro-
acetamidohexil-adenosina-5'-monofosfato (0,1 milimol) en
aproximadamente 10 mililitros (ml) de agua y se añadieron
25 microlitros (ul) de tri-n-butilamina (0,1 milimol). Se
separó el agua a vacío y el residuo se disolvió en 10 ml
de dimetilformamida seca (DMF) que se separó después a va-
30 cío. El residuo se evaporó de la DMF seca tres veces más.

1 El residuo final se disolvió en 10 ml de DMF seca. Se añadi-
dieron 80 mg de N,N'-carbonildiimidazol (0,5 milimoles)
y se dejó que transcurriese la reacción durante 1,5 horas.
Se añadieron luego 15 ml de agua y se separó el disolvente
5 a vacío. El residuo (N⁶-trifluoroacetamidohexil-adenosina-
-5'-monofosfato-imidazoluro) se disolvió en 10 ml de DMF.

Se disolvieron 47 mg de riboflavin-5'-monofosfato
(0,1 milimol) en aproximadamente 10 ml de agua y se añadi-
dieron gota a gota a 20 ml de acetona que contenían 43 µl
10 de tri-n-octilamina (0,1 milimol). Se formó un precipitado
antes que la adición fuese completa. Se separó el disolven-
te con un evaporador rotativo hasta que se disolvió el
riboflavin-5'-monofosfato. Se añadieron después 5 ml de
acetona y 5-10 ml de DMF, y la mezcla se llevó a sequedad.
15 El residuo se disolvió en 15-20 ml de DMF seca y se llevó
a sequedad (este procedimiento se repitió 3 veces). El re-
siduo se disolvió en 5 ml de DMF y se combinó con la solu-
ción arriba mencionada de 10 ml del imidazoluro en DMF.

La mezcla de reacción se dejó en reposo a la tem-
20 peratura ambiente durante una noche y luego se separó el
disolvente. El residuo se tomó en 50 ml de agua y se aplicó
a una columna de 2,5 x 25 centímetros (cm) de DEAE-celulo-
sa en la forma de bicarbonato (Whatman DE23, Reeve Angel,
Clifton, Nueva Jersey, EE.UU.). El cromatograma se reveló
25 con un gradiente lineal generado con 2 litros (l) de agua
y 2 litros de bicarbonato de amonio 0,3 molar (M) (se re-
cogieron fracciones de 23 ml). La cromatografía en capa
delgada sobre gel de sílice 60 F254 (E. Merck, Darmstadt,
Alemania Occidental) utilizando una mezcla 7:3 volumen:vo-
lumen (v:v) de etanol - bicarbonato de trietilamonio 1 M

1 (pH 7,5) mostró que las fracciones numeradas de la 68 a
la 73 contenían los compuestos amarillos mayor ($R_f = 0,75$)
y menor ($R_f = 0,36$). Estas fracciones se reunieron y el
espectro de absorción óptica tenía máximos a 267, 373 y
5 450 nanometros (nm).

Se separó el disolvente del material reunido y
el residuo se disolvió en aproximadamente 5 ml de agua.
Esta solución se ajustó a pH 11,0 con hidróxido de sodio
5N y se dejó en reposo a la temperatura ambiente durante
10 9 horas. La cromatografía en capa delgada mostró que el
componente con $R_f = 0,75$ desapareció mientras que aparecía
un nuevo material amarillo con $R_f = 0,37$. La mezcla de reac-
ción se ajustó a pH 8,0 con ácido clorhídrico y se aplicó
a una columna de 2,5 x 20 cm de DEAE-celulosa en la forma
15 de bicarbonato. El cromatograma se reveló con un gradiente
lineal desarrollado con 1 litro de agua y 1 litro de bicar-
bonato de amonio 0,2 M. El efluente amarillo de la columna
se reunió y se separó el disolvente. El residuo se adsorbió
sobre 2 gramos (g) de gel de sílice que se puso encima de
20 una columna de 50 g de gel de sílice equilibrado con una
mezcla 9:2 (v:v) de etanol - bicarbonato de trietilamonio
1 M (pH 7,5). La columna se eluyó con una mezcla 8:2 (v:v)
de etanol - bicarbonato de trietilamonio 1 M (pH 7,5), se
recogió el componente amarillo con $R_f = 0,37$, y se separó
25 el disolvente. El rendimiento basado en la absorbancia a
450 nm era aproximadamente 10%.

N^6 -(6-aminohexil)-dinitrofenil-flavina-adenina-
-dinucleótido.

El residuo de la operación anterior que contenía
flavina- N^6 -aminohexil-adenina-dinucleótido se purificó por

1 cromatografía sobre Sephadex G-10 (Pharmacia Fine Chemi-
cals, Uppsala, Suecia). A una columna de 0,9 x 30 cm equi-
librada con bicarbonato de sodio 25 milimolar (mM) (pH 7,5)
a la temperatura ambiente se aplicó 1 ml de una solución
5 aproximadamente 10 mM del derivado N⁶-FAD en agua. El pri-
mer pico eluido de material que absorbía a 450 nm se reco-
gió y se recromatografió sobre Sephadex G-10 y el primer
pico eluido se recogió de nuevo.

10 0,5 ml (0,63 micromoles) del derivado N⁶-FAD
purificado en bicarbonato de sodio 25 mM (pH 7,5) se mez-
claron con 2 ml de etanol y se añadieron 10 μ l de ³H-dini-
trofluorobenceno (6,3 μ moles, 50 μ Ci) en etanol (el dini-
trofluorobenceno tritiado se obtuvo del Radiochemical Cen-
tre, Amersham, Reino Unido). La mezcla de reacción se agi-
15 tó continuamente durante la noche en la oscuridad a la
temperatura ambiente y se aplicó luego a una columna de
0,9 x 30 cm de Sephadex G-10 equilibrada con tampón de
fosfato 0,1 M (pH 7,0) que contenía azida de sodio al
0,1%. El pico simple de material que absorbía a 450 nm
20 se recogió y se encontró que contenía 8% del trazador ra-
diactivo.

B. Preparación de apoglucosa-oxidasa

25 Glucosa-oxidasa purificada con baja actividad
de catalasa obtenida de la Research Products Division de
Miles Laboratories, Inc., Elkhart, Indiana, EE.UU., se
dializó 2 veces durante 12 horas cada vez contra manita
al 0,5% peso:volumen (p:v) (30 volúmenes cada vez). Se
liofilizaron partes alícuotas del dializado que contenían
100 miligramos (mg) de glucosa-oxidasa cada una y se al-
30 macenaron a -20°C.

1 Se disolvió seroalbúmina de bovinos (200 mg)
en 12 ml de agua ajustada a pH 1,6 con ácido sulfúrico
concentrado, se mezcló con 150 mg de carbón vegetal (gra-
do RIA, de Schwarz-Mann, Orangeburg, Nueva York, EE.UU.),
5 y se enfrió a 0°C. La glucosa-oxidasa liofilizada (100 mg)
se redisolvió en 3,1 ml de agua y se añadieron 3 ml a la
suspensión albúmina-carbón vegetal agitada que continuó
agitándose durante 3 minutos. Se filtró luego la suspen-
sión a través de un filtro Millipore de 0,8 micras y 25
milímetros (mm) de diámetro (Millipore Corp., Bedford,
Massachusetts, EE.UU.) montado en un aparato de filtra-
ción Sweenex (Millipore Corp.) sobre una jeringuilla de
plástico desechable de 50 ml. El filtrado se neutralizó
rápidamente a pH 7,0 por adición de 2 ml de tampón de
15 fosfato 0,4 M (pH 7,6) y después de ello hidróxido de so-
dio 5N. Se añadió luego carbón vegetal seco (150 mg) y se
agitó durante 1 hora a 0°C. La suspensión resultante se
filtró primero a través de un filtro Millipore de 0,8 mi-
20 cras y luego a través de un filtro Millipore de 0,22 mi-
cras. Se añadió al filtrado glicerina hasta 25% (v:v) y la
preparación de apoglucosa-oxidasa estabilizada se almace-
nó a 4°C.

C. Reactivos de Ensayo

1. Conjugado marcado: Se diluyó N^6 -(6-aminohexil)-
25 -DNP-FAD en tampón de fosfato 0,05 M (pH 7,0) a
una concentración de 118 nM.
2. Apoenzima: Se diluyó apoglucosa-oxidasa con tam-
pón de fosfato 0,1 M (pH 7,0) que contenía 0,1%
de seroalbúmina de bovino hasta una concentración
de 958 nM de puntos de fijación de FAD. La con-

1 centración de puntos de fijación de FAD de la pre-
paración de apoenzima se determinó experimentalmen-
te midiendo la cantidad mínima de FAD requerida pa-
ra dar una actividad máxima de glucosa-oxidasa cuan-
do se incubó con la apoenzima.

5 3. Antisuero: Se obtuvo antisuero contra un conjugado
de dinitrofenil-seroalbúmina de bovino de Miles-Ye-
da, Ltd, Rehovot, Israel, y se diluyó 31 veces en
tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,0) que contenía 0,1%
10 de seroalbúmina de bovino.

4. Patrones: Las soluciones patrón contenían concentra-
ciones conocidas de N-2',4'-dinitrofenil-6-amino-
caproato preparado en tampón de fosfato 0,05 M
(pH 7,0).

15 5. Reactivo de detección: Se preparó un reactivo de
glucosa-oxidasa por mezcla de 45 ml de tampón de
fosfato 0,1 M (pH 7,0) que contenía 15 mM de ácido
etilendiamintetraacético, 9 ml de 3,5-dicloro-2-
-hidroxibenceno-sulfonato 11,5 mM en agua ajustado
20 a pH 7 con hidróxido de sodio, 9 ml de 4-aminoanti-
pirina 11,5 mM en agua que contenía 1,25 mg/ml de
peroxidasa (Miles Laboratories, Inc., Elkhart, In-
diana, EE.UU.), y 6 ml de glucosa 1,0 M en solución
acuosa saturada de ácido benzoico.

25 D. Procedimientos de Ensayo

1. Adición de apoenzima antes de la iniciación de la reacción de fijación

Método nº 1: Se añadieron los productos siguientes
en secuencia a cubetas de reacción separadas: 0,1
30 ml de la solución de conjugado marcado, 0,05 ml

1 de una solución patrón seleccionada, 0,1 ml de la solu-
ción de antisuero, 2,0 ml del reactivo de detección, y
0,1 ml de la solución de apoenzima. Cada mezcla de reac-
5 ción se incubó durante 30 minutos a 30°C y se midió la
absorbancia a 520 nm.

Método nº 2: Se añadieron los productos siguientes en
secuencia a cubetas de reacción separadas: 0,1 ml de la
solución de conjugado marcado, 0,05 ml de una solución
10 patrón seleccionada, 0,1 ml de la solución de antisuero,
y 0,1 ml de la solución de apoenzima. Cada mezcla de
reacción se incubó durante 20 minutos a la temperatura
ambiente y luego se añadieron a cada una 2,0 ml del
reactivo de detección. Después de una incubación adicio-
15 nal durante 15 minutos a 30°C, se midió en cada cubeta
la absorbancia a 520 nm.

2. Adición de apoenzima después de la iniciación de la
reacción de fijación

Método nº 3: Se añadieron los productos siguientes en
secuencia a cubetas de reacción separadas: 0,1 ml de
20 solución de conjugado marcado, 0,05 ml de una solución
patrón seleccionada, y 0,1 ml de la solución de anti-
suero. Cada mezcla de reacción se incubó durante 20 mi-
nutos a la temperatura ambiente y luego se añadieron a
cada una 2,0 ml del reactivo de detección y 0,1 ml de
25 la solución de apoenzima. Después de incubación adicio-
nal durante 30 minutos a 30°C, se midió en cada cubeta
la absorbancia a 520 nm.

Método nº 4: Se añadieron los productos siguientes en
secuencia a cubetas de reacción separadas: 0,1 ml de
30 la solución de conjugado marcado, 0,05 ml de una solu-

1 ción patrón seleccionada, y 0,1 ml de la solución de
antisuero. Cada mezcla de reacción se incubó durante
20 minutos a la temperatura ambiente y luego se añadi-
5 eron a cada una 0,1 ml de la solución de apoenzima.
Después de incubación adicional durante 20 minutos se
añadieron a cada cubeta 2,0 ml del reactivo de detec-
ción. Se incubó luego cada mezcla de reacción durante
15 minutos a 30°C y se midió en cada cubeta la absor-
bancia a 520 nm.

10 E. Resultados

En la Tabla 2 siguiente se muestran los resultados de
los cuatro procedimientos de ensayo en la determinación
de N-2',4'-dinitrofenil-6-aminocaproato. Las concentra-
ciones de N-2',4'-dinitrofenil-6-aminocaproato se expre-
15 san como concentraciones en los volúmenes finales de 2,35
ml de la mezcla de reacción. Los resultados de absorban-
cia se expresan como el valor medio de operaciones dupli-
cadas corregido por la actividad de enzima residual y la
absorbancia de fondo en los reactivos. El factor de co-
20 rrección se da para cada método de ensayo al final de la
Tabla 2, y se determinó por operaciones experimentales
empleando tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,0) en sustitución
de la totalidad de las soluciones de conjugado marcado,
patrón, y antisuero.

TABLA 2

| Concentración de N-2',4'-dinitrofenil-6-aminocaproato (nm) | Absorbancia Media Corregida a 520 nm | | | |
|--|--------------------------------------|------------|------------|------------|
| | Método Nº1 | Método Nº2 | Método Nº3 | Método Nº4 |
| 1021 | 0,274 | 1,089 | 0,205 | 1,399 |
| 511 | 0,263 | 0,992 | 0,197 | 1,302 |
| 255 | 0,235 | 0,898 | 0,187 | 1,136 |
| 128 | 0,221 | 0,689 | 0,173 | 0,958 |
| 64 | 0,194 | 0,545 | 0,155 | 0,737 |
| 32 | 0,165 | 0,365 | 0,134 | 0,534 |
| 16 | 0,141 | 0,276 | 0,133 | 0,353 |
| 8 | 0,134 | 0,225 | 0,122 | 0,257 |
| 4 | 0,122 | 0,193 | 0,104 | 0,229 |
| 2 | 0,123 | 0,187 | 0,109 | 0,215 |
| 0 | 0,107 | 0,171 | 0,101 | 0,199 |
| <hr/> | | | | |
| Factor de corrección | 0,241 | 0,108 | 0,216 | 0,108 |

1 Los resultados demuestran que la presente inven-
ción proporciona un método de ensayo de fijación específi-
ca del tipo homogéneo en el que la apoenzima se introduce
antes o después de la iniciación de la reacción de fija-
5 ción.

EJEMPLO 2

Ensayo de Fijación Heterogénea para Tiroxina

A. Preparación del conjugado marcado N⁶-(2-aminoetil)-tiro-
xina-flavina-adenina-dinucleótido

10 6-(2-Aminoetil)-amino-9-(2',3'-O-isopropiliden-β-D-
-ribofuranosil)purina.

Se añadieron 13,56 g (41,5 milimoles) de 6-cloro-
9-(2',3'-O-isopropiliden-β-D-ribofuranosil)purina [Ham-
ton y otros, J. Am. Chem. Soc. 83:150 (1961) 7, con agita-
15 ción durante un período de 15 minutos a un exceso frío de
1,2-diaminoetano (75 ml). La solución resultante se dejó
en reposo a la temperatura ambiente durante 24 horas. Se
evaporó la solución a vacío y el aceite amarillo resultan-
te se agitó con 50 ml de bicarbonato de sodio saturado
20 frío. La mezcla se evaporó a vacío y el residuo resultante
se evaporó adicionalmente repetidas veces a vacío, prime-
ramente en agua (3 veces, en 50 ml) y luego en 2-propanol
(4 veces en 50 ml) para obtener un vidrio amarillo (15 g).
Una porción (3 g) del vidrio se hizo pasar a través de una
25 columna de 25 x 55 centímetros (cm) de cambiador de catión
Dowex 50W-X2 en la forma amonio (Bio-Rad Laboratories, Rich-
mond, California, EE.UU.).

La columna se eluyó con un gradiente lineal gene-
rado con 2 l de agua y 2 l de bicarbonato de amonio 0,5 M.
30 La elución se completó utilizando un gradiente lineal gene-

1 rado con 2 l de bicarbonato de amonio de cada una de las
 concentraciones 0,5 M y 1 M. El efluente de la columna se
 recogió en fracciones de 19 ml y se analizó por elución
 sobre placas de cromatografía en capa delgada (TLC) de gel
 5 de sílice (E. Merck, Darmstadt, Alemania Occidental) con
 una mezcla 9:1 (v:v) de etanol e hidróxido de amonio. Las
 placas de TLC reveladas se examinaron bajo luz ultravioleta,
 y se pulverizaron después con el reactivo ninhidrina
 [Randerath, Thin Layer Chromatography, Academic Press (1966)].

10 Las fracciones numeradas 250 a 350 procedentes de la cromatografía en columna se reunieron y se evaporaron a vacío dejando la purina deseada como un vidrio amorfo amarillo pálido (1,5 g).

Análisis: Calculado para $C_{15}H_{22}N_6O_4$:

15 C, 51,42; H, 6,33; N, 23,99

Encontrado: C, 50,92; H, 6,54; N, 23,01.

RMN (60 MHz, $CDCl_3$): δ 1,37 (s, 3H, isopropilideno),
 1,63 (s, 3H, isopropilideno), 5,92 (d, 1H, 1'-ri-
 bosa), 7,90 (s, 1H, purina), 8,26 (s, 1H, purina).

20 Rotación óptica: $[\alpha]_D^{20} = -74,85^\circ$ (c 1,0, CH_3OH)

El producto bruto restante (12 g) se purificó por cromatografía sobre Dowex 50 W-X2 como se describe arriba.

El rendimiento global fue 8 g (55%).

25 Acido α -(N-trifluoroacetil)-amino- β -[3,5-diiodo-4-(3',5'-
 -diiodo-4'-hidroxifenoxi)-fenil]propanoico.

Se preparó este compuesto por el método de Blank, J. Pharm. Sci. 53: 1333 (1964). A una suspensión enfriada (0°C) y agitada de 5 g (6,4 milimoles) de L-tiroxina (Sigma Chemical Co., San Luis, Missouri, EE.UU.) en 60 ml de acetato de etilo seco se añadieron 11,5 ml de ácido trifluoroacé-

1 tico y 1,9 ml de anhídrido trifluoroacético. Después de
30 minutos, la solución clara resultante se lavó 3 veces
con 30 ml de agua, una vez con 30 ml de bicarbonato de so-
5 dio al 5%, y dos veces con 50 ml de cloruro de sodio satu-
rado. Los lavados acuosos reunidos se extrajeron 2 veces
con 20 ml de acetato de etilo. Las capas de acetato de
etilo se reunieron y se lavaron con 30 ml de agua, después
de lo cual se secaron sobre sulfato de magnesio. La solu-
10 ción de acetato de etilo seca se evaporó a vacío dejando
un sólido blanco. La recristalización en una mezcla de
éter etílico y éter de petróleo dió un sólido de color
blanco-rosado (3,95 g, rendimiento 70,5%) que fundía a
228-230°C con descomposición.

Análisis: Calculado para $C_{17}H_{10}F_3I_4NO_5$:

15

C, 23,39; H, 1,15; N, 1,60

Encontrado: C, 23,00; H, 1,05; N, 1,65

RMN $\left[60 \text{ MHz, DCON}(\text{CD}_3)_2 \right] \delta$ 7,28 (s, 2H, aro-
mático), 8,03 (s, 2H, aromático), 9,7 (m,
1H, amido)

20

IR (KCl): 1700 ($>C=O$)

Rotación óptica $\left[\alpha \right]_D^{25} = -14,97^\circ$ (c 1,0, sulfó-
xido de dimetilo)

25

Una segunda recristalización produjo un segundo precipi-
tado (0,95 g), p.f. 224-228°C. con descomposición. El ren-
dimiento global fue 87,5%.

N- $\left\{ 2-\left[N\text{-}(\text{trifluoroacetil})-3,3',5,5'\text{-tetrayodotironil} \right]- \right.$
-aminoetil $\left. \right\} -2',3'\text{-O-isopropiliden-adenosina.}$

30

Una solución de 8,72 g (10,0 milimoles) de ácido
 α -(N-trifluoroacetil)amino- β - $\left[3,5\text{-diyodo-4-(3',5'\text{-diyodo-4'\text{-hidroxifenoxi})-fenil} \right]$ propanoico y 3,86 g (11,0 mili-

1 moles) de 6-(2-aminoetil)amino-9-(2',3'-O-isopropilideno-
 β -D-ribofuranosil)purina en 50 ml de dimetilacetamida
 seca se preparó en una atmósfera de argón seco a -20°C . A
 esta solución agitada fría se añadió una solución de 3,04
 5 g (11,0 milimoles) de difenilfosforil-azida (Aldrich Che-
 mical Co., Milwaukee, Wisconsin, EE.UU.) en 10 ml de dime-
 tilacetamida seca seguidos por la adición de 1,6 ml (11,0
 milimoles) de trietilamina seca. La solución se dejó a la
 temperatura ambiente durante 22 horas. Se añadió luego la
 10 solución gota a gota a 300 ml de agua fría (0°C) con agi-
 tación. El precipitado blanco resultante se recogió por
 filtración y se secó a vacío (56°C) para dar 13,0 g de un
 sólido de color crema claro. El sólido se disolvió en 500
 ml de acetona y la solución se concentró por ebullición.
 15 El sólido blanco que precipitó a partir de la solución
 acetónica hirviente se recogió por filtración mientras se
 encontraba caliente. La ebullición continuada del filtra-
 do produjo dos precipitados adicionales. Los tres precipi-
 tados se reunieron para dar 8 g (rendimiento, 56,6%) de
 20 un sólido blanco, p.f. $198-200^{\circ}\text{C}$ (descomposición).

Análisis: Calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{F}_3\text{I}_4\text{N}_7\text{O}_8$:

C, 31,89; H, 2,51; N, 8,14

Encontrado: C, 31,95; H, 2,60; N, 7,86

RMN $\left[220 \text{ MHz, } (\text{CD}_3)_2\text{SO} \right] \delta$ 1,32 (s, 3H, isopropi-
 25 lideno), 1,55 (s, 3H, isopropilideno), 6,14
 (d, 1H, 1'-ribosa), 7,02 (s, 2H, tiroxina),
 7,82 (s, 2H, tiroxina), 8,25 (s, 1H, purina),
 8,36 (s, 1H, purina), 8,41 (t, 1H, J=6, amido),
 9,64 (d, 1H, J=8, trifluoroacetamido)

Rotación óptica $\left[\alpha \right]_D^{25} = -11,82^{\circ}$ (c 1,0, piridina)

1 Acido N- { 2- [N-(trifluoroacetil)-3,3',5,5'-tetrayodo-
tironil] aminoetil } -2',3'-O-isopropiliden-5'-adenilico,
sal de monotrietilamina monohidratada

5 Una solución de 1,2 g (1,0 milimoles) de N- { 2-
 [N-(trifluoroacetil)-3,3',5,5'-tetrayodotironil] -amino-
 etil } -2',3'-O-isopropiliden-adenosina en 10 ml de fosfato
 de trietilo seco se preparó en una atmósfera de argón se-
 co a 0°C. A la solución fría y agitada se añadieron 0,45
 ml (5 milimoles) de oxiclورو fosforoso. La solución re-
 10 sultante se mantuvo durante 24 horas a 0°C, después de lo
 cual se añadió gota a gota con agitación a 1 l de agua de
 hielo. El precipitado resultante se recogió por filtración
 y se secó a vacío para dar 1,23 g de un sólido blanco. El
 sólido se disolvió en acetona y se añadieron 0,32 ml (2,2
 15 milimoles) de trietilamina. Se formó un precipitado. La
 mezcla se evaporó a vacío y el residuo resultante se lixi-
 vió con acetona seca, después de lo cual se recristalizó
 en una mezcla de alcohol metílico seco y éter etílico seco
 para dar 390 mg (rendimiento del 27,8%) de un sólido blan-
 20 co, p.f. 173-183°C (descomposición).

Análisis: Calculado para $C_{38}H_{48}F_3I_4N_8O_{12}P$:

C, 32,50; H, 3,45; N, 7,98

Encontrado: C, 32,24; H, 3,08; N, 7,58

25 RMN [60 MHz, $(CD_3)_2SO$] δ 1,53 (s, 3H, isopropi-
 lideno), 6,2 (d, 1H, 1'H-ribosa), 7,1 (s, 2H,
 aromático de tiroxina), 7,87 (s, 2H, aromáti-
 co de tiroxina), 8,27 (s, 1H, purina), 8,52
 (s, 1H, purina)

Rotación óptica [α]_D²⁵ = -17,50° (c 1,0, CH₃OH)

30 Acido N- { 2- [N-Trifluoroacetil)-3,3',5,5'-tetrayodotironil]
 27079

1 aminoetil } -5'-adenílico.

5 Se suspendieron 200 mg (0,14 milimoles) de monohidrato de la sal de monotrietilamina del ácido N-{2-[N-(trifluoroacetil-3,3',5,5'-tetrayodotironil]-aminoetil} 2',3'-O-isopropiliden-5'-adenílico en 1 ml de agua (0°C) y se añadió ácido trifluoroacético (9 ml) gota a gota con agitación. Al cabo de 30 minutos se obtuvo una solución clara. La solución se mantuvo fría (0°C) durante 15 horas más, y luego se evaporó a vacío (30°C). El residuo resultante se evaporó 4 veces a vacío (25°C) a partir de 20 volúmenes de alcohol etílico anhidro y luego se secó a vacío (25°C) dejando un sólido blanco.

10 El sólido se agitó durante 30 minutos con 10 ml de alcohol metílico frío, después de lo cual se recogió por filtración y se secó a vacío (25°C) para dar un sólido blanco (135 mg, rendimiento del 76%) que fundió lentamente con descomposición por encima de 188°C.

15 Análisis: Calculado para $C_{29}H_{27}F_3I_4N_7O_{11}P$:

C, 27,97; H, 2,19; N, 7,87

20 Encontrado: C, 28,11; H, 2,31; N, 7,65

RMN [220 MHz, $(CD_3)_2SO$] δ 5,95 (d, 1H, 1'-ribosa), 7,04 (s, 2H, aromático de tiroxina), 7,84 (s, 2H, aromático de tiroxina), 8,25 (s, 1H, purina), 8,36 (s, 1H, purina), 8,43 (m, 1H, amido), 9,66 (d, 1H, trifluoroacetamido)

25 Rotación óptica $[\alpha]_D^{25} = -2,72^\circ$ (c 1,0, piridina)

Conjugado de Flavina-adenina-dinucleótido - tiroxina

Se disolvieron 498 mg (0,4 milimoles) de ácido N-{2-[N-(trifluoroacetil)-3,3',5,5'-tetrayodotironil]-aminoetil}-5'-adenílico en 10 ml de dimetilformamida seca

1 y se añadió tri-n-butilamina (96 μ l, 0,4 milimoles), segui-
do por la adición de 1,1'-carbonildiimidazol (320 mg, 2,0
milimoles). Después de agitar durante 18 horas a la tem-
peratura ambiente en ausencia de humedad, se añadió agua
5 (280 μ l) y luego se evaporó el disolvente a vacío.

El aceite resultante se secó por evaporación re-
petida a vacío a partir de dimetilformamida seca (4 veces en
10 ml). El fosforimidazolidato resultante se redisolvió en
10 ml de dimetilformamida seca y se añadió gota a gota a
una solución de 0,4 milimoles de la sal de tri-n-octilami-
na de riboflavin-5'-monofosfato en 10 ml de dimetilforma-
mida seca. La sal se preparó por adición de una solución
de la sal de amonio de riboflavin-5'-monofosfato (192 mg,
0,4 milimoles) en 10 ml de agua a una solución agitada
15 de tri-n-octilamina (176 μ l, 0,4 milimoles) en 100 ml de
acetona. Al cabo de 30 minutos, la mezcla resultante se
evaporó a vacío. El residuo se secó por evaporación repe-
tida a vacío a partir de dimetilformamida seca, dejando
la sal en forma de un sólido anaranjado.

20 La solución anterior que contenía el fosforimi-
dazolidato y la sal de riboflavin-5'-monofosfato se divi-
dió en dos partes alícuotas iguales al cabo de 24 horas y
una parte alícuota se evaporó a vacío. El residuo resultan-
te se cromatografió en una columna (2,5 x 78 cm) prepara-
da a partir de 100 g de Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine
25 Chemicals, Uppsala, Suecia) que se había hinchado previa-
mente (18 horas) en una mezcla 19:1 (v:v) de dimetilforma-
mida y bicarbonato de trietilamonio (1 M, pH 7,5). La co-
lumna se eluyó con la mezcla 19:1 anterior (v:v) y se re-
30 cogieron fracciones de 10 ml. El efluente de la columna

1 se analizó por elución sobre placas de gel de sílice para cromatografía en capa delgada RP-2 silanizado 60 (E. Merck, Darmstadt, Alemania Occidental).

5 Las placas de cromatografía en capa delgada se revelaron utilizando una mezcla 40:40:25:1:1 (v:v) de acetona, cloroformo, alcohol metílico, agua, y trietilamina. Las fracciones numeradas del 11 al 17 procedentes de la cromatografía en columna arriba mencionada se reunieron y evaporaron a vacío. El residuo se cromatografió en una
10 columna (2,5 x 75 cm) preparada a partir de 125 g de Sephadex LH-20 que se había hinchado previamente (18 horas) en bicarbonato de amonio 0,3 M. La columna se eluyó con bicarbonato de amonio 0,3 M, recogándose fracciones de 10 ml. El efluente se analizó por absorción de luz ultravioleta a 254 nm. El volumen de las fracciones se aumentó
15 a 20 ml, comenzando con la fracción número 150. La concentración de sal del eluyente se redujo de manera gradual como sigue: bicarbonato de amonio 0,15 M en la fracción número 295, bicarbonato de amonio 0,075 M en la fracción número 376, y agua en la fracción número 430. Se recogió
20 un total de 480 fracciones. Las fracciones numeradas del 200 al 235 se combinaron y se evaporaron a vacío dejando el conjugado marcado como un residuo amarillo anaranjado. Una solución acuosa alcalina de este residuo exhibía máxi-
25 mos de absorción en ultravioleta en las longitudes de onda siguientes: 266 nm, 350 nm, 373 nm, y 450 nm. El rendimiento, estimado a partir de la absorción a 450, era aproximadamente 5%.

Una preparación de fosfodiesterasa (Worthington Biochemical Corp., Freehold, Nueva Jersey, EE.UU.) aislada

1 de veneno de serpientes (Crotalus Adamanteus) hidrolizó el producto anterior a riboflavin-5'-monofosfato y el ácido 5'-adenílico sustituido con tiroxina en el que el grupo trifluoroaceto bloquante había sido eliminado.

5 Descripción adicional de la preparación de conjugados marcados de este tipo puede encontrarse en la solicitud de patente de los EE.UU. presentada en la misma fecha de esta solicitud titulada "Conjugados Flavina-Adenina-Dinucleótido -- Yodotironina" (Minuta Nº 11795) y cedida a la presente firma cesionaria.

10 B. Preparación de apoglucosa-oxidasa

Se utilizó apoenzima preparada de acuerdo con la parte B del Ejemplo 1.

C. Reactivos de Ensayo

- 15 1. Conjugado marcado: Se diluyó N^6 -(2-aminoetil)-tiroxina-FAD en tampón de fosfato 0,1 M (pH 7) a una concentración de 1 μ M.
- 20 2. Apoenzima: Se diluyó apoglucosa-oxidasa con tampón de fosfato 0,1 M (pH 7) a una concentración de 0,6 μ M de puntos de fijación de FAD (definidos como en la parte C-2 del Ejemplo 1).
- 25 3. Anticuerpo insolubilizado: Se añadió una torta lavada y húmeda de gel de Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) activada por bromuro de cianógeno de acuerdo con el método de March y otros, Anal. Biochem. 60:119 (1974) a una solución de 85 mg de anticuerpos (aislados de antisuero contra un conjugado de tiroxina-seroalbúmina de bovino) en 20 ml de tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,0) y se agitó lentamente durante 36 horas a 4°C. Una

30

27079

1 vez completada la reacción de copulación, se añadió 1 ml
de alanina 1 M y se continuó la agitación mediante sa-
cudidas durante 4 horas más para bloquear los puntos
que no habían reaccionado. El anticuerpo fijado a Se-
5 pharose resultante se lavó en un embudo sinterizado con
400 ml de acetato de sodio 50 mM - cloruro de sodio 500
mM (pH 5), y cantidad igual de tampón de fosfato 50 mM-
cloruro de sodio 500 mM (pH 7), y 800 ml de tampón de
fosfato 100 mM (pH 7). La torta de filtración húmeda
10 se suspendió luego en tampón de fosfato 100 mM (pH 7)
que contenía 0,01% de azida de sodio para dar 22 ml de
una suspensión aproximadamente al 50%.

4. Patrón: Una solución madre 1,15 mM de tiroxina en hi-
dróxido de sodio 5 mM se diluyó a 2 μ M en tampón de
fosfato 0,1 M (pH 7).
15
5. Reactivo de detección: Se preparó un reactivo de ensayo
de glucosa-oxidasa que contenía la mezcla siguiente por
cada 130 μ l: 25 μ l de peroxidasa de concentración 1,2
mg/ml (Sigma Chemical Co., San Luis, Missouri, EE.UU.)
20 en tampón de fosfato 0,1 M (pH 7), 5 μ l de 4-aminoanti-
pirina 10 mM en agua, 20 μ l de 3,5-dicloro-2-hidroxi-
benceno-sulfonato 25 mM en tampón de fosfato 0,1 M
(pH 7), 30 μ l de seroalbúmina de bovino al 16,5% en tam-
pón de fosfato 0,1 M (pH 7), y 50 μ l de glucosa 1 M en
25 solución acuosa saturada de ácido benzoico.

D. Procedimiento de ensayo

Se prepararon mezclas de reacción de fijación
por mezclado de 150 μ l de la suspensión de anticuerpos in-
solubilizada, 80 l de la solución de conjugado marcado,
30 diversas cantidades de la solución patrón de tiroxina para
27079

1 dar concentraciones variables de tiroxina en las mezclas
de reacción, y un volumen suficiente de tampón de fosfato
0,1 M (pH 7) para hacer un volumen total de 500 μ l . Las
mezclas de reacción se incubaron con agitación mediante
5 sacudidas durante dos horas a 25°C. Cada mezcla de reac-
ción se filtró luego a vacío a través de un pipeta pasteur
seca y rellena con lana de vidrio, tratada previamente con
soluciones de peryodato y etilenglicol para eliminar una
posible contaminación con FAD. A una parte alícuota de
10 300 μ l de cada filtrado se añadieron 130 μ l del reactivo
de detección y 50 μ l de la solución de apoenzima. Al cabo
de 1 hora, se determinó la absorbancia de cada mezcla de
reacción a 520 nm.

E. Resultados

15 En la Tabla 3 siguiente se muestran los resulta-
dos del procedimiento de ensayo en la determinación de ti-
roxina. Los resultados de absorbancia se expresan como el
promedio de operaciones duplicadas corregidas por la acti-
vidad de enzima residual en la solución de apoenzima (ab-
20 sorbancia de 0,522) y por FAD endógena en la suspensión
de anticuerpos (absorbancia 0,142).

TABLA 3

| <u>Volumen de patrón de tiroxina añadido (μl)</u> | <u>Absorbancia media corregida a 520 nm</u> |
|--|---|
| 0 | 0,223 |
| 25 | 0,221 |
| 75 | 0,281 |
| 250 | 0,286 |

30 Los resultados demuestran que la presente in-
vención proporciona un método de ensayo de fijación es-

1 específica útil del tipo heterogéneo.

EJEMPLO 3

Ensayo de Fijación Específica para Tiroxina

5 A. Preparación del conjugado marcado - N⁶-(6-aminohexil)-
-tiroxina-flavina-adenina-dinucleótido

6-(6-Aminohexil)amino-9-(2',3'-O-isopropiliden-β-D-ribofuranosil)-purina.

10 Se añadieron 16,0 g (50 milimoles) de 6-cloro-9-
-(2',3'-O-isopropiliden-β-D-ribofuranosil)-purina [Hampton y otros, J. Am. Chem. Soc. 83:1501(1961)], con agitación, a una muestra fundida (70°C) de 1,6-diaminohexano recientemente destilado (58 g, 500 milimoles). La mezcla resultante se agitó bajo argón a 40°C durante 18 horas. El exceso de diamina se separó por destilación a presión reducida (60°C, 0,91 mm de Hg). El residuo amarillo pálido resultante se adsorbió sobre 150 g de gel de sílice 60 (E. Merck, Darmstadt, Alemania Occidental) y se utilizó para rellenar la parte superior de una columna cromatográfica preparada a partir de una suspensión de gel de sílice 60 (2 kg) en una mezcla 9:1 (v:v) de alcohol etílico absoluto y bicarbonato de trietilamonio (pH 7,5, 1 M). La columna se eluyó con la mezcla de disolventes 9:1 (v:v) anterior y se recogieron 900 fracciones de 20 ml. Las fracciones se examinaron por cromatografía en capa delgada (TLC) sobre gel de sílice 60, eluyendo con una mezcla 7:3 (v:v) de alcohol etílico absoluto y bicarbonato de trietilamonio (pH 7,5, 1M). Las fracciones numeradas 391 a 900 procedentes de la columna cromatográfica se reunieron y se evaporaron a vacío dejando 15,0 g de un residuo vítreo (rendimiento, 74%). Una muestra de 1 g del vidrio se disolvió

15
20
25
30

1 en un volumen pequeño de alcohol metílico que se aplicó
 luego a la parte superior de una columna preparada a partir
 de 80 g de Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala,
 Suecia) previamente hinchada en alcohol metílico. La
 5 columna se eluyó con alcohol metílico. Se recogieron un total
 de 90 fracciones de 8 ml. Las fracciones se examinaron
 por cromatografía de capa delgada sobre gel de sílice 60
 eluyendo con una mezcla 7:3 (v:v) de alcohol etílico absoluto
 y bicarbonato de trietilamonio (pH 7,5, 1 M). Las
 10 fracciones numeradas 19 a 27 procedentes de la cromatografía
 en columna se reunieron y se evaporaron a vacío dejando
 910 g (recuperación del 91%) de un vidrio blanco.

Análisis: Calculado para $C_{19}H_{30}N_6O_4$:

C, 56,14; H, 7,44; N, 20,68.

15 Encontrado: C, 53,91; H, 7,33; N, 19,18

RMN (60 MHz, $CDCl_3$): δ 1,40 (s, 3H, isopropilideno),
 1,63 (s, 3H, isopropilideno) 5,98
 (d, 1H, 1'-ribosa), 7,92 (s, 1H, purina),
 8,36 (s, 1H, purina)

20 Rotación óptica $[\alpha]_D^{25} = -50,11^\circ$ (c 1,0, alcohol metílico)

N-{6-[N-Trifluoroacetil)-3,3',5,5'-tetrayodotironil]amino-
 hexil}-2',3'-O-isopropiliden-adenosina.

25 Una solución de 4,36 g (5,0 milimoles) de ácido
 α -(N-trifluoroacetil)amino- β -[3,5-diiodo-4-(3',5'-diiodo-
 do-4'-hidroxifenoxi)-fenil-propanoico, preparada como se
 describe en la parte A del Ejemplo 2 arriba, y 2,24 g (5,5
 milimoles) de 6-(6-aminohexil)amino-9-(2',3'-O-isopropilideno-
 β -D-ribofuranosil)purina en 100 ml de dimetilformamida
 30 seca se preparó en una atmósfera de argón seco a $-20^\circ C$. A

1 esta solución agitada fría se añadió una solución de 1,52 g
 (5,5 milimoles) de difenilfosforilazida (Aldrich Chemical
 Co., Milwaukee, Wisconsin, EE.UU.) en 50 ml de dimetilfor-
 mamida seca, seguida por la adición de 0,8 ml (5,5 milimo-
 5 les) de trietilamina seca. La solución se dejó a la tempe-
 ratura ambiente durante 22 horas. La solución se añadió lue-
 go gota a gota a 600 ml de agua fría (0°C), con agitación.
 El precipitado blanco resultante se recogió por filtración
 y se secó a vacío (60°C) para dar 4,90 g (rendimiento, 78%)
 10 de un sólido blanco. Una muestra de este sólido se recrís-
 talizó en una mezcla de acetona y agua dando un sólido blan-
 co, p.f. 205-207°C (descomposición).

Análisis: Calculado para $C_{36}H_{38}F_3N_7O_8$:

C, 34,28; H, 3,04; N, 7,77

15 Encontrado: C, 34,22; H, 2,99; N, 7,41

Espectro de masas (20 ma) m/e: 1262 $[MH^+]$,

1164 $[M^+]$ menos $COCF_3$

Rotación óptica $[\alpha]_D^{25} = -21,89^\circ$ (c 1,0, piridina)

Monohidrato de la Sal de Monotrietilamina del Acido N- $\{6-$
 20 $-[N$ -trifluoroacetil)-3,3',5,5'-tetrayodotironil $\}$ aminohe-
 $xil\}$ -2',3'-O-isopropiliden-5'-adenílico.

Una solución de 1,89 g (1,5 milimoles) de N- $\{6-$
 25 $-[N$ -(trifluoroacetil)-3,3',5,5'-tetrayodotironil $\}$ amino-
 $hexil\}$ -2',3'-O-isopropiliden-adenosina en 15 ml de fosfato
 de trietilo seco se preparó en una atmósfera de argón seco
 a -10°C. A la solución agitada y fría se añadieron 0,68 ml
 (7,5 milimoles) de oxiclорuro de fósforo. La solución re-
 sultante se mantuvo durante 18 horas a -15°C, y se añadió
 luego gota a gota con agitación a 1,5 litros de mezcla de
 30 agua y hielo. El precipitado resultante se recogió por

1 - filtración y se secó a vacío para dar 1,91 g (rendimiento,
87%) de un sólido blanco. El sólido se disolvió en 10 ml
de alcohol metílico y se añadieron 0,38 ml (2,6 milimoles)
de trietilamina. Esta solución se evaporó a vacío y el re-
5 siduo resultante se recrystalizó en una mezcla de alcohol
metílico y éter etílico para dar 720 mg (rendimiento, 33%)
de un sólido blanco, p.f. 151-154°C (descomposición).

Análisis: Calculado para $C_{42}H_{56}F_3I_4N_8O_{12}P$:

C, 34,54; H, 3,86; N, 7,67

10 Encontrado: C, 35,24; H, 3,88; N, 7,75

Espectro de masas (20 ma) m/e: 1342 $[MH^+]$,

1244 $[M^+]$ menos $COCF_3$

Rotación óptica $[\alpha]_D^{25} = -17,20^\circ$ (c 1,0, CH_3OH)

15 Ácido N-{6-[N-(trifluoroacetyl)-3,3',5,5'-tetrayodotironil]aminohexil}-5'-adenílico.

Se suspendieron 600 mg (0,41 milimoles) de mono-
hidrato de la sal de monotrietilamina del ácido N-{6-[N-
-(trifluoroacetyl)-3,3',5,5'-tetrayodotironil]aminohexil}-
2',3'-O-isopropiliden-5'-adenílico en 0,6 ml de agua (0°C)
20 y se añadió ácido trifluoroacético (6 ml) gota a gota, con
agitación. Después de 50 minutos se obtuvo una solución
clara. La solución se mantuvo fría (0°C) durante 15 horas
adicionales, después de lo cual se evaporó a vacío (30°C).
El residuo resultante se evaporó a vacío 5 veces a partir
25 de volúmenes de 20 ml de alcohol etílico anhidro, después
de lo cual se trituró con 30 ml de agua y se lavó con un
volumen pequeño de alcohol metílico. El sólido blanco re-
sultante (430 mg) se recrystalizó en alcohol metílico para
dar 290 mg (rendimiento, 54,6%) de sólido blanco, p.f. 180-
30 183°C (descomposición).

1 - Análisis: Calculado para $C_{33}H_{35}F_3I_4N_7O_{11}P$:
 C, 30,46; H, 2,71; N, 7,54
 Encontrado: C, 30,77; H, 2,55; N, 7,29
 Espectro de masas (20 ma) m/e: 1302 $[MH^+]$,
 5 1204 $[M^+]$ menos $COCF_3$

Conjugado Flavina-adenina-dinucleótido- Tiroxina.

Se pusieron 130,13 mg (0,1 milimoles) de ácido
 N-{6-[N-(trifluoroacetil)-3,3',5,5'-tetrayodotironil]amino-
 hexil}-5'-adenílico en una atmósfera de argón. Se añadió
 10 a esta muestra una solución de 14 μ l (0,1 milimol) de tri-
 etilamina en 1 ml de dimetilformamida seca, seguido por la
 adición de una solución de 16,2 mg (0,1 milimoles) de
 1,1'-carbonildiimidazol en 1 ml de dimetilformamida seca.
 Al cabo de 24 horas, se añadió un segundo equivalente de
 15 1,1'-carbonildiimidazol (16,2 mg) en 1 ml de dimetilforma-
 mida seca. Se dejó que la reacción anterior transcurriese
 durante un total de 48 horas a la temperatura ambiente con
 exclusión de humedad. Una muestra de 47,3 mg (0,1 milimol)
 de la sal de amonio de riboflavina-5'-monofosfato se con-
 20 virtió en la correspondiente sal de tri-n-octilamina como
 se describe en la parte A del Ejemplo 2. Esta sal se disol-
 vió en 3 ml de dimetilformamida seca y se añadió a la so-
 lución anterior que contenía el fosforimidazolidato del áci-
 do adenílico intermedio.

25 La solución resultante se dejó en reposo en la
 oscuridad a la temperatura ambiente con exclusión de hume-
 dad durante 24 horas. Se evaporó el disolvente a vacío y
 el residuo resultante se cromatografió en una columna (2,5
 x 78 cm) preparada a partir de 100 g de Sephadex LH-20 (Phar-
 macia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) que se había hin-

1 chado previamente (18 horas) en una mezcla 19:1 (v:v) de
dimetilformamida y bicarbonato de trietilamonio (1 M, pH
7,5). La columna se eluyó con la mezcla 19:1 (v:v) ante-
rior y se recogieron fracciones de 5 ml. El efluente de
5 la columna se analizó por elución sobre placas de gel de
sílice 60 silanizado RP-2 para cromatografía en capa delgada
(E. Merck, Darmstadt, Alemania Occidental). Las placas de
cromatografía en capa delgada se revelaron utilizando una
mezcla 40:40:25:1:1 (v:v) de acetona, cloroformo, alcohol
10 metílico, agua, y trietilamina.

Las fracciones numeradas 24 a 38 de la cromato-
grafía en columna se reunieron y se evaporaron a vacío.
El residuo se cromatografió en una columna (2,5 x 85 cm)
preparada a partir de 125 g de Sephadex LH-20 que se había
15 hinchado previamente (18 horas) en bicarbonato de amonio
0,1 M. La columna se eluyó con un gradiente lineal genera-
do a partir de 2 litros de bicarbonato de amonio 0,1 M y
2 litros de agua, y se recogieron fracciones de 23 ml. El
efluente se analizó por absorción en ultravioleta (254 nm).
20 Las fracciones numeradas 170 a 182 se reunieron y se eva-
poraron a vacío. El residuo se cromatografió en una columna
(2,5 x 55 cm) preparada a partir de 80 g de Sephadex LH-20
que se había hinchado previamente en bicarbonato de amonio
0,05 M. La columna se eluyó con un gradiente lineal genera-
do a partir de 2 litros de bicarbonato de amonio 0,05 M y
25 2 litros de bicarbonato de amonio 0,02 M. El efluente se
analizó por absorción en ultravioleta (254 nm). Se continuó
la elución con 2 litros de bicarbonato de amonio 0,2 M,
recogiéndose fracciones de 23 ml. Se recogió un total de
30 257 fracciones. Las fracciones numeradas del 70 al 110 se

1 reunieron y se evaporaron a vacío dejando el conjugado mar-
cado como un residuo amarillo-anaranjado. Una solución acuo-
sa alcalina de este residuo exhibía máximos de absorción
en ultravioleta en las longitudes de onda siguientes: 270
5 nm, 345 nm, y 450 nm. El rendimiento, estimado a partir de
la absorción a 450 nm, era aproximadamente del 5%.

Una preparación de fosfodiesterasa (Worthington
Biochemical Corp., Freehold, Nueva Jersey, EE.UU.) aislada
a partir de veneno de serpientes (Crotalus Adamanteus) hi-
10 drolizó el producto arriba indicado a riboflavin-5'-mono-
fosfato y el ácido 5'-adenílico sustituido con tiroxina en
el que se había eliminado el grupo bloqueante trifluoro-
acetilo.

15 Descripción adicional de la preparación de con-
jugados marcados de este tipo puede encontrarse en la so-
licitud de patente de los EE.UU. Nº de Serie 917.962, pre-
sentada el 22 de junio de 1978, y cedida a la presente fir-
ma cesionaria.

B. Preparación de apoglucosa-oxidasa

20 Se dializó glucosa-oxidasa y se liofilizó como
en la parte B del Ejemplo 1 anterior. Una porción de la
glucosa-oxidasa liofilizada (80 mg) se disolvió en 20 ml
de glicerina al 30% (v:v) y la solución se ajustó a pH 1,4
por adición de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). La so-
25 lución se incubó a 4°C durante 2 horas y luego se hizo pa-
sar a través de una columna de Sephadex G-50 (Pharmacia
Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) a 4°C, equilibrada con
glicerina al 30% (v:v) ajustada a pH 1,4 con H_2SO_4 con-
centrado. El pico de proteína eluido se recogió (27 ml,
30 que contenían 74% en peso de material añadido a la columna)

1 y se disolvieron en el producto eluido recogido 200 mg
de seroalbúmina de bovino. Se añadió después carbón vege-
tal (600 mg; grado RIA, de Schwarz-Mann, Orangeburg, Nue-
va York, EE.UU.) y se neutralizó la mezcla por adición de
5 4,0 ml de tampón de fosfato 0,4 M (pH 8,0) y suficiente
NaOH 2N para ajustar el pH a 7,0. La mezcla se agitó du-
rante 60 minutos a 4°C y se filtró sucesivamente a través
de filtros Millipore de 0,8 μ y 0,22 μ (Millipore Corp.,
Bedford, Massachusetts, EE.UU.). Se añadió azida de sodio
10 (10%, peso:volumen) para dar una concentración final en
la mezcla de 0,1%.

C. Reactivos de ensayo

- 15 1. Conjugado marcado: Se diluyó N⁶-(6-aminohexil)-ti-
roxina-FAD en tampón de fosfato 0,1 M que contenía
0,1% de seroalbúmina de bovino (pH 7,0) a una con-
centración de 400 nM.
- 20 2. Apoenzima: Se diluyó apoglucosa-oxidasa en tampón
de fosfato 0,1 M que contenía 0,1% de seroalbúmina
de bovino (peso:volumen) (pH 7,0) a una concentra-
ción 4,0 micronormal (μ N) de puntos de fijación
de FAD (véase la parte C-2 del Ejemplo 1).
- 25 3. Antisuero: Se bombeó solución saturada de sulfato
de amonio (7,5 ml) (0,1 ml/minuto) a la temperatura
ambiente en 15 ml de antisuero anti-tiroxina de co-
nejo, agitando, en un baño de hielo. La suspensión
resultante se dejó en reposo durante 2 horas a 4°C,
sin agitación. Se recogió el precipitado por cen-
trifugación, se disolvió en 3 ml de tampón de bora-
to 50 mM enfriado con hielo (pH 8,6) y se dializó
30 durante la noche contra 1 litro de tampón de borato

1 50 mM (pH 8,6). La solución de inmunoglobulina se lle-
vó luego al volumen de antisuero original por adición
de tampón de borato 50 mM (pH 8,6). La solución de
5 inmunoglobulina se diluyó además en tampón de fosfato
0,1 M que contenía 0,1% (peso:volumen) de seroalbúmi-
na de bovino (pH 7,0) para uso en los procedimientos
de ensayo descritos a continuación en las proporciones
indicadas. /

10 4. Patrones: Se utilizó sal de sodio de tiroxina (Sigma
Chemical Co., San Luis, Missouri, EE.UU.) como una
solución madre de 1 mg/ml valorada en solución en
agua destilada con hidróxido de sodio 2N hasta un pH
final de 10,2. Se prepararon patrones por dilución de
15 esta solución madre en tampón de fosfato 0,1 M que
contenía 0,1% (peso:volumen) de seroalbúmina de bovi-
no (pH 7,0).

20 5. Reactivo de detección: Se preparó un reactivo de en-
sayo de glucosa-oxidasa por mezcla de 11 partes de tam-
pón de fosfato 0,15 M (pH 7,0) que contenía 1,8% (pe-
so:volumen) de seroalbúmina de bovino, 2 partes de
4-aminoantipirina 2,0 mM que contenía 0,6 mg/ml de
peroxidasa, 2 partes de sulfonato de 3,5-dicloro-2-
-hidroxibenceno 20 mM en tampón de fosfato 0,1 M (pH
25 7,0); y 2 partes de glucosa 1,0 M en solución acuosa
saturada de ácido benzoico.

D. Procedimientos de Ensayo

1. Adición de todos los reactivos sin etapa de pre-in- cubación

30 Se añadieron los siguientes reactivos en secuen-
cia a cubetas de reacción separadas: 0,05 ml de la solu-

1 ción de conjugado marcado, 0,05 ml de una solución patrón
seleccionada, 0,1 ml de una dilución 1:4 de la solución
de antisuero en el tampón de fosfato, 1,7 ml del reactivo
de detección, y 0,1 ml de la solución de apoenzima. Cada
5 mezcla de reacción se incubó durante 30 minutos a 20°C y
se midió la absorbancia a 520 nm.

2. Pre-incubación con antisuero

Se añadieron los siguientes reactivos en secuen-
cia a cubetas de reacción separadas: 0,05 ml de la solu-
10 ción de conjugado marcado, 0,05 ml de una solución patrón
seleccionada, y 0,1 ml de una dilución 1:16 de la solu-
ción de antisuero en el tampón de fosfato. Cada mezcla
de reacción se incubó durante 20 minutos a 20°C y luego
se añadieron 1,7 ml del reactivo de detección y 0,1 ml
15 de la solución de apoenzima a cada una, sucesivamente.
Después de una incubación adicional durante 30 minutos
a 20°C, se midió la absorbancia a 520 nm en cada cubeta.

3. Pre-incubación con apoenzima

Se añadieron los reactivos siguientes en se-
cuencia a cubetas de reacción separadas: 0,05 ml de la
20 solución de conjugado marcado, 0,05 ml de una solución pa-
trón seleccionada, y 0,1 ml de la solución de apoenzima.
Cada mezcla de reacción se incubó durante 20 minutos a
20°C y luego se añadieron a cada una sucesivamente 0,1 ml
25 de una dilución 1:2 de la solución de antisuero en el tam-
pón de fosfato y 1,7 ml del reactivo de detección. Después
de una incubación adicional durante 30 minutos a 20°C,
se midió la absorbancia a 520 nm en cada cubeta.

4. Pre-incubación secuencial con antisuero en primer lugar y posteriormente con apoenzima

30

27079

1 Se añadieron los reactivos siguientes en secuen-
cia a cubetas de reacción separadas: 0,05 ml de la solu-
ción del conjugado marcado, 0,05 ml de una solución patrón
5 seleccionada, y 0,1 ml de una dilución 1:32 de la solución
de antisuero en el tampón de fosfato. Cada mezcla de reac-
ción se incubó durante 20 minutos a 20°C y luego se añadie-
ron 0,1 ml de la solución de apoenzima a cada una. Después
de incubación adicional durante 20 minutos a 20°C, se aña-
dieron 1,7 ml del reactivo de detección a cada cubeta y se
10 midió la absorbancia a 520 nm en cada una de ellas después
de una incubación de 30 minutos a 20°C.

5. Pre-incubación secuencial con apoenzima en primer
lugar y posteriormente con antisuero

15 Se añadieron los reactivos siguientes en se-
cuencia a cubetas de reacción separadas: 0,05 ml de la
solución del conjugado marcado, 0,05 ml de una solución
patrón seleccionada, y 0,1 ml de la solución de apoenzima.
Cada mezcla de reacción se incubó durante 20 minutos a
20°C y se añadieron después a cada una 0,1 ml de una di-
20 lución 1:32 de la solución de antisuero en el tampón de
fosfato. Después de una incubación adicional durante 20
minutos a 20°C, se añadieron 1,7 ml del reactivo de detec-
ción a cada cubeta y se midió la absorbancia a 520 nm en
cada una después de una incubación de 30 minutos a 20°C.

25 6. Pre-incubación con antisuero y apoenzima juntamente

Se añadieron los siguientes reactivos en secuen-
cia a cubetas de reacción separadas: 0,05 ml de la solu-
ción de conjugado marcado, 0,05 ml de una solución patrón
seleccionada, 0,1 ml de la solución de apoenzima, y 0,1
30 ml de una dilución 1:32 de la solución de antisuero en el

1 — tampón de fosfato. Cada mezcla de reacción se incubó du-
rante 20 minutos a 20°C y luego se añadieron a cada una
1,7 ml del reactivo de detección. Después de una incuba-
ción adicional de 30 minutos a 20°C, se midió la absor-
5 bancia a 520 nm en cada cubeta.

E. Resultados

10 Se llevaron a cabo los ensayos en duplicado
con muestras en blanco apropiadas. Se encontró que para
los métodos 1-3 la concentración de tiroxina en la solu-
ción patrón era directamente proporcional a la actividad
de glucosa-oxidasa, mientras que para los métodos 4-6
la concentración de tiroxina era inversamente proporcional
a la actividad de enzima. Para los métodos 1-3 en ausen-
cia de tiroxina, la activación de enzima estaba inhibida,
15 en tanto que para los métodos 4-6 la activación de enzima
estaba exaltada. Se encontró también que los métodos 4-6
eran algo más sensibles para la tiroxina que los otros
métodos. La razón o razones por la(s) cual(es) la activa-
ción de enzima estaba diferentemente inhibida o exaltada
20 dependiendo de la secuencia de reacción no se conoce por
completo; sin embargo, los resultados demostraron que
la presente invención proporciona un método de ensayo es-
pecífico homogéneo para determinar tiroxina utilizando una
gran diversidad de secuencias de reacción.

25

EJEMPLO 4

Ensayo de Fijación Homogénea para Teofilina

A. Preparación del conjugado marcado: Teofilina-FAD

30

A una solución de 2,4 micromoles de flavina-N⁶-
-aminohexil-adenina-dinucleótido, preparada como se des-
cribe en la parte A del Ejemplo 1 anterior, en 200 µl de

27079

1 sulfóxido de dimetilo bajo argón gaseoso se añadieron 0,9
mg de 1,3-dimetil-1,6,7,8-tetrahidropirido[1,2-e]purina-
5 -2,4,9(3H)-triona (3,62 micromoles), preparada de acuerdo
con el método de Cook y otros, Res. Comm. in Chem. Pathol.
and Pharm. 13:497(1976), seguido al cabo de 4 horas por
adición de 1,8 mg adicionales (7,3 micromoles) de la mis-
ma. Después de agitar durante la noche, se evaporó el di-
solviente a vacío (0,1 mm Hg) y el residuo se cromatogra-
10 fió en una columna de 2,5 x 90 cm cargada con Sephadex
IH-20 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y se
eluyó con tampón de bicarbonato de trietilamonio 0,3 M
(pH 7,8). El producto bruto eluido entre 210 y 246 ml
del efluente se recogió, se aplicó a una placa de gel de
15 sílice de 20 x 20 cm x 1000 μ y se eluyó con una mezcla
8:2 de etanol:tampón de bicarbonato de trietilamonio 1 M
(pH 7,8). La banda que contenía el producto deseado
($R_f = 0,77$) se separó de la placa por raspado, se extrajo
con tampón de bicarbonato de trietilamonio 1 M (pH 7,8),
se filtró y se concentró. La purificación final por recro-
20 matografía sobre Sephadex IH-20 eluida con el tampón a
concentración 0,3 M dió 1,26 μ moles del conjugado marcado,
como se determinó por medida de la absorbancia a 450 nm,
lo que equivalía a un rendimiento de 53%.

B. Reacciones de fijación de anticuerpos

25 Se crearon anticuerpos en conejos contra el
inmunógeno 8-(3-carboxipropil)-1,3-dimetilxantina-BSA
como se describe por Cook y otros, Res. Comm. in Chem.
Pathol. Pharm. 13:497 (1976).

30 Las reacciones de fijación de anticuerpos se
condujeron a la temperatura ambiente en tampón de fosfato

1 de sodio 0,1 M (pH 7,0) y se realizaron medidas de actividad de glucosa-oxidasa en el mismo tampón a 20°C.

Los reactivos utilizados en el ensayo fueron como sigue:

| 5 | <u>Reactivo</u> | <u>Composición</u> |
|----|-----------------|--|
| | A | Tampón de fosfato de sodio 0,1 M (pH 7,0) |
| | B | Conjugado marcado de teofilina FAD 565 nM, 6, N ⁶ -(6-aminohexil)-FAD (el derivado de FAD) 160 nM |
| 10 | C | antisuero contra la teofilina (diluido 10 veces en Reactivo A) |
| | D | apoglucosa-oxidasa (50 nM de puntos de fijación de FAD por ml) |
| 15 | E | reactivo de detección: 200 µg de peroxidasa/ml; 0,71 mM de 4-aminoantipirina; 7,1 mM de sulfonato de 3,5-dicloro-2-hidroxibenceno; 353 mM de glucosa; y 35 mg de BSA/ml. |

20 Los reactivos A, B, y C se combinaron en cubetas de reacción separadas en las proporciones indicadas en la Tabla 4 a continuación. Se añadieron luego rápida y sucesivamente el reactivo D (100 µl) y el Reactivo E (283 µl) a cada mezcla de reacción, seguidos por incubación durante 30 minutos a 20°C. Se midió después la absorbancia a 520 nm para cada cubeta. Los resultados que

25 se muestran en la Tabla 4 son los valores medios de operaciones duplicadas.

TABLA 4

| Número de reacción | Reactivo A (ul) (tampón) | Reactivo de IPAD | Reactivo B (ul) (conjugado marcado) | Reactivo C (ul) (antisuero) | Absorbancia [520 nm] |
|-----------------------|-----------------------------|---------------------|---|--------------------------------|-------------------------|
| 1 | 617 | - | - | - | 0,046 |
| 2 | 517 | 100 | - | - | 0,584 |
| 3 | 507 | 100 | - | 10 | 0,644 |
| 4 | 477 | 100 | - | 40 | 0,631 |
| 5 | 357 | 100 | - | 160 | 0,629 |
| 6 | 497 | - | 20 | - | 0,690 |
| 7 | 587 | - | 20 | 10 | 0,314 |
| 8 | 577 | - | 20 | 20 | 0,216 |
| 9 | 532 | - | 20 | 40 | 0,224 |
| 10 | 517 | - | 20 | 80 | 0,22 |
| 11 | 437 | - | 20 | 160 | 0,21 |

1 Los resultados de las reacciones 2-5 muestran que
el antisuero no influía en la actividad del derivado de FAD
(esto es, no se copulaba con la teofilina). Las reacciones
6-11 demostraron que niveles crecientes de antisuero con-
5 tra la teofilina reducían la actividad del conjugado mar-
cado con relación a su aptitud para combinarse con la apo-
enzima.

C. Ensayos de fijación competitiva

10 Estas reacciones se llevaron a cabo como se re-
seña en la parte B anterior, excepto que niveles prefijados
de teofilina se combinaron con los Reactivos A y B antes
de la adición a los mismos del Reactivo C y también que pa-
ra el Reactivo C se utilizó una dilución del antisuero a
un volumen 100 veces mayor. Los resultados se muestran en
15 la Tabla 5 a continuación.

 Las reacciones 1-3 eran testigos que mostraban
que el anticuerpo contra la teofilina reduce la capacidad
del conjugado marcado para combinarse con la apoenzima.
Las reacciones 4-9 demuestran que la actividad de FAD aumen-
20 ta en proporción al nivel de teofilina en la mezcla de reac-
ción.

27079

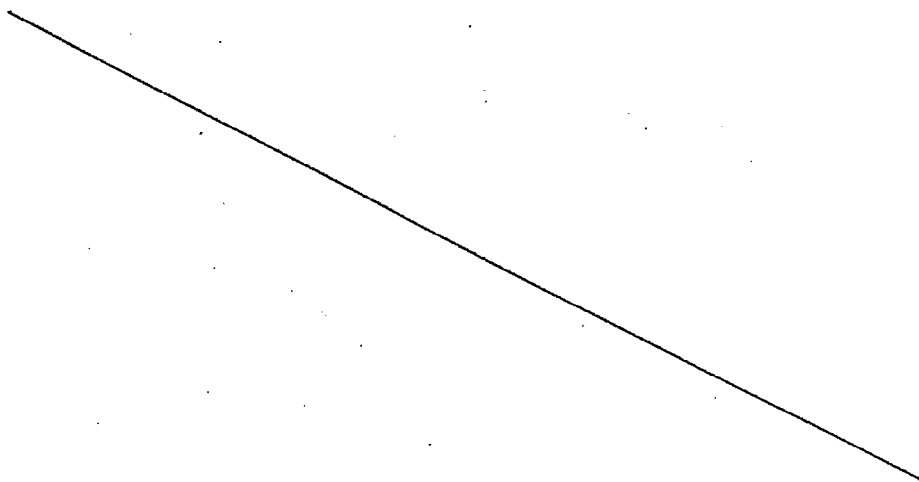


TABLA 5

| Número de Reacción | Reactivo A (ul) (tampon) | Reactivo B (ul) (conjugado marcado) | Teofilina volumen añadido (ul) | concentra ción (uM) | Reactivo C (ul) (antisuero) | Absorbancia (520 nm) |
|--------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|---------------------|-----------------------------|----------------------|
| 1 | 617 | - | - | - | - | 0,047 |
| 2 | 597 | 20 | - | - | - | 0,932 |
| 3 | 497 | 20 | - | - | 100 | 0,364 |
| 4 | 397 | 20 | 100 | 10 | 100 | 0,703 |
| 5 | 447 | 20 | 50 | 10 | 100 | 0,649 |
| 6 | 397 | 20 | 100 | 1,0 | 100 | 0,507 |
| 7 | 447 | 20 | 50 | 1,0 | 100 | 0,481 |
| 8 | 397 | 20 | 100 | 0,1 | 100 | 0,418 |
| 9 | 447 | 20 | 50 | 0,1 | 100 | 0,377 |

1

EJEMPLO 5

Ensayo de Fijación Homogénea para IgG Humana

A. Preparación del conjugado marcado: IgG-FAD

5 A 4,24 mg de flavina-N⁶-aminohexil-adenina-dinucleótido, preparado como se describe en la parte A del Ejemplo 1 anterior, se añadieron 2,5 mg de diclorhidrato de dimetiladipimidato (Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois, EE.UU.) en 1 ml de agua y 5 µl de trietilamina. La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 10 minutos y se añadieron luego 40 mg de inmunoglobulina humana (IgG) en 1 ml de tampón de pirofosfato de sodio 0,1 M (pH 8,5). Después de agitar adicionalmente a la temperatura ambiente durante 3 horas, se aplicó la mezcla de reacción a una columna de 2,5 x 50 cm de Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) equilibrada y se eluyó con tampón de fosfato de sodio 0,1 M (pH 7,0). Las fracciones procedentes del primer pico de elución que tenían una absorbancia a 450 nm se recogieron y se dializaron sucesivamente contra 4 litros de tampón de fosfato de sodio 0,1 M (pH 7,0) durante 16 horas, 4 litros de tampón de fosfato de sodio 0,1 M (pH 7,0) que contenían cloruro de sodio 1 M durante 24 horas, y tampón de fosfato de sodio 0,01 M (pH 7,0) durante 48 horas. Se añadió luego azida de sodio hasta 0,1% (peso:volumen). El material de reacción se filtró a través de un filtro Millipore de 0,22 micras, y se almacenó.

25

B. Reacciones de Fijación de Anticuerpos

Los reactivos utilizados en el ensayo fueron como sigue:

| <u>Reactivo</u> | <u>Composición</u> |
|-----------------|---|
| 30 A | Tampón de fosfato de sodio 0,1 M (pH 7,0) |

27079

- 1 B 4-aminoantipirina 10 mM
- C glucosa 1,0 M
- D sulfonato de 3,5-dicloro-4-hidroxibence-
no 25 mM en Reactivo A
- 5 E peroxidasa de rábano picante, 1,2 mg/ml
en Reactivo A
- F seroalbúmina de bovino al 30% (peso:vo-
lumen) (Research Products Division, Mi-
les Laboratories, Inc., Elkhart, IN.
EE.UU.)
- 10 G conjugado marcado IgG-FAD en solución
almacenada procedente de arriba
- H apoglucosa-oxidasa
- I antisuero de conejo contra IgG humana
(obtenido de Behring Diagnostics, So-
merville, Nueva Jersey, EE.UU.)
- 15 J patrones: IgG humana en Reactivo A a ni-
veles predeterminados

Se prepararon mezclas de reactivos como sigue:

- 20 Mezcla nº 1 - 180 μ l de Reactivo A, 20 μ l de Reactivo B,
100 μ l de Reactivo D y 5 μ l de Reactivo G
(5,4 μ M)
- 25 Mezcla Nº 2 - 0,3 ml de volumen total de diversas propor-
ciones que contenían el volumen de Reactivo
I indicado en la Tabla 6 a continuación, es-
tando constituido el volumen restante por
Reactivo A
- 30 Mezcla nº 3 - 80 μ l de Reactivo D, 50 μ l de Reactivo E,
33 μ l de Reactivo F, 137 μ l de Reactivo A
y 1,6 μ l de Reactivo H (4,2 μ N de puntos de
fijación de FAD)

1

A 300 μ l de la Mezcla nº 1 se añadieron 300 μ l de la Mezcla nº 2 y 300 μ l de Reactivo A en cubetas de reacción separadas. Después de al menos 10 minutos de incubación a la temperatura ambiente, se añadieron 300 μ l de Mezcla nº 3 a cada mezcla de reacción. Después de incubación adicional durante 30 minutos a 20°C, se midió la absorbancia a 520 nm en cada cubeta. Los resultados fueron como sigue:

5

TABLA 6

10

| <u>Volumen de antisuero añadido para preparar la mezcla nº 2</u> | <u>Absorbancia (520 nm)</u> |
|--|-----------------------------|
| 0 | 0,859 |
| 2 | 0,750 |
| 4 | 0,602 |
| 6 | 0,494 |
| 8 | 0,443 |
| 10 | 0,415 |
| 12 | 0,408 |
| 14 | 0,392 |
| 16 | 0,375 |

15

20

Los resultados demuestran que a medida que aumenta el nivel de anticuerpos, disminuye la actividad de glucosa-oxidasa generada por el conjugado marcado de FAD frente a IgG.

25

C. Ensayos de fijación competitiva

Estas reacciones se llevaron a cabo utilizando los reactivos descritos en la parte B anterior. Niveles prefijados de IgG humana en volúmenes de 300 μ l de Reactivo A se combinaron con Mezcla nº 1 en cubetas de reacción separadas. Después de ello se añadió una mezcla de 12 μ l

30

1 de Reactivo I y 288 μ l de Reactivo A a cada mezcla de reac-
 ción. Al cabo de 10 minutos se añadieron 300 μ l de Mezcla
 nº 3, y las mezclas de reacción se incubaron a 20°C durante
 5 30 minutos. Al final de este período, se midió la absorban-
 cia a 520 nm en cada cubeta. Los resultados fueron como si-
 gue:

TABLA 7

| | Cantidades de IgG Humana añadida (μ g) | Absorbancia (520 nm) |
|----|---|-------------------------|
| 10 | 0 | 0,579 |
| | 4 | 0,653 |
| | 8 | 0,751 |
| | 12 | 0,844 |
| | 16 | 0,986 |
| 15 | 24 | 1,06 |

Así, se demostró que la presente invención pro-
 porciona un ensayo de fijación específica para determinar
 el ligando de alto peso molecular, IgG humana, en medios
 líquidos.

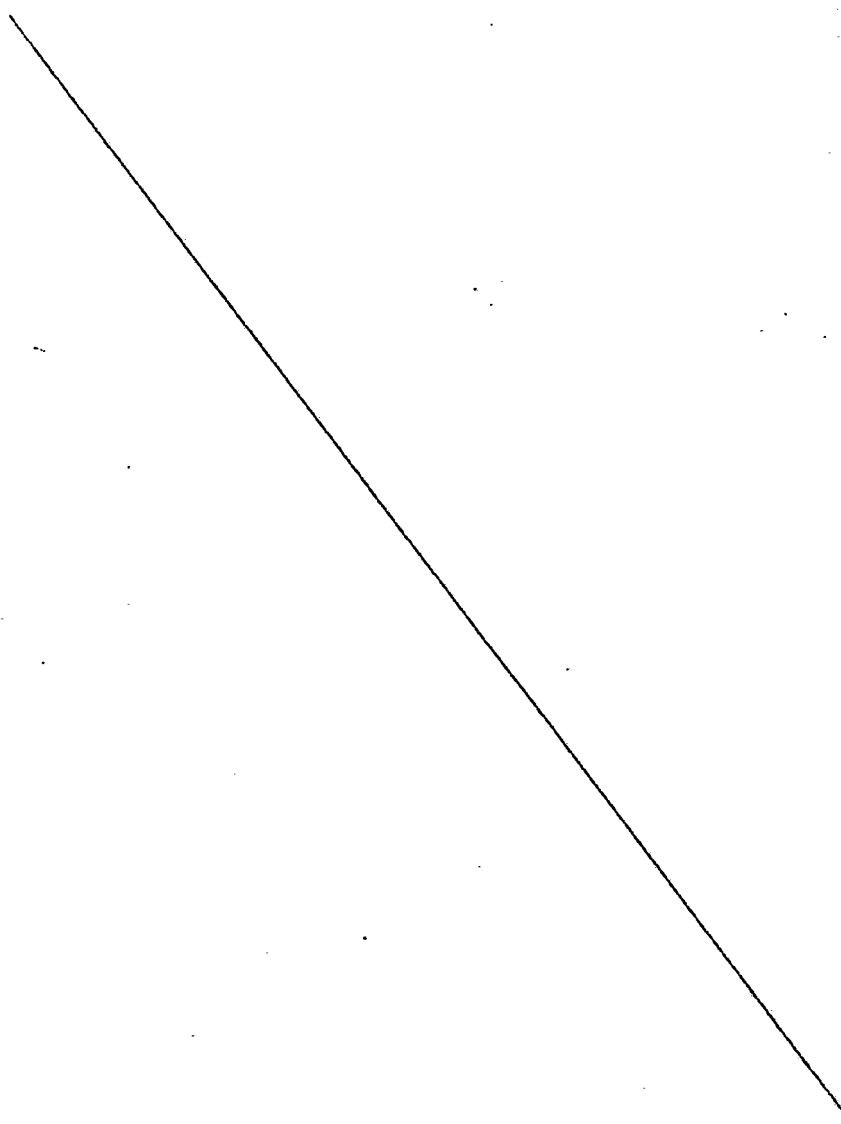
20 MEDIOS REACTIVOS

Como resultará evidente para aquéllos que traba-
 jan en el campo pertinente a partir de la descripción y
 los ejemplos que anteceden, los medios reactivos empleados
 para la realización del método presente pueden asumir una
 25 gran diversidad de formas. En particular, tales medios reac-
 tivos pueden tomar la forma de una composición de ensayo
 unitaria, tal como una forma sólida o líquida apropiada.
 Como ilustración, una forma de una composición de ensayo
 para determinar un ligando de acuerdo con la presente in-
 30 vención comprende (a) un conjugado marcado que comprende

1 un grupo prostético orgánico copulado al ligando o un aná-
logo de fijación del mismo, (b) una pareja de fijación es-
pecífica del ligando, y (c) una apoenzima capaz de combi-
narse con el grupo prostético para producir una holoenzima.
5 Una tal composición de ensayo puede comprender también
reactivos para medir la actividad de la holoenzima y, en
caso deseado y apropiado, el conjugado marcado y la apoen-
zima pueden combinarse en la forma de su complejo de enzima
conjugado. Por supuesto, en la composición de ensayo pueden
10 estar comprendidos también diluyentes, materiales tampón,
estabilizadores, etc., convencionales.

Asimismo, los medios reactivos pueden tomar la
forma de un estuche de ensayo, es decir, una combinación
empaquetada de recipientes que contienen los elementos
15 reactivos necesarios. Nuevamente como ilustración, una
forma de un estuche de ensayo para determinar un ligando
de acuerdo con la presente invención comprende uno o más
recipientes que contienen (a) un conjugado marcado que
comprende un grupo prostético orgánico copulado al ligan-
do o un análogo de fijación del mismo, (b) una pareja de
20 fijación específica del ligando, y (c) una apoenzima capaz
de combinarse con el grupo prostético para producir una
holoenzima. Un tal estuche de ensayo puede proporcionar
también, en uno o más de los diferentes recipientes, reac-
25 tivos para medir la actividad de la holoenzima y, en caso
deseado y apropiado, el conjugado marcado y la apoenzima
pueden combinarse en la forma de su complejo de enzima con-
jugado. En una realización, el estuche de ensayo compren-
de al menos dos recipientes separados, uno de los cuales
30 contiene el conjugado marcado, y opcionalmente, reactivos

1 para medir la actividad de holoenzima, conteniendo el otro
la pareja de fijación y la apoenzima. Por supuesto, el es-
tuche de ensayo puede incluir otros reactivos como los co-
5 nocidos en la técnica y que pueden ser deseables desde un
punto de vista comercial y del usuario, tales como tampo-
nes, diluyentes, patronos, etcétera.



1

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

15

20

25

1ª.- Un método de ensayo de fijación específico para determinar un ligando en un medio líquido, que comprende las etapas de: poner en contacto dicho medio líquido con (a) medios de reactivo que incluyen un conjugado marcado que tiene un componente de marcado que comprende un resto de un grupo prostético orgánico y que tiene también un componente de fijación produciendo un tal contacto un sistema de reacción de fijación en el que se forman una especie química fijada y una especie química libre de dicho conjugado marcado, siendo la proporción de componente de marcado en las dos especies químicas formadas citadas función de la presencia de dicho ligando en dicho medio líquido, y (b) una apoenzima capaz de combinarse con dicho grupo prostético para producir una holoenzima, y determinar la proporción de componente de marcado en dichas dos especies químicas formadas midiendo la actividad de holoenzima en dicha especie química fijada o en dicha especie química libre, o en ambas.

30

2ª.- El método de la reivindicación 1ª en el que dicho medio líquido se pone en contacto con dicha apoenzima después del contacto con dichos medios reactivos.

27079

3ª.- El método de la reivindicación 1ª en el que

1 dicho medio líquido se pone en contacto con dichos medios reactivos y dicha apoenzima de un modo sustancialmente simultáneo.

5 4ª.- El método de la reivindicación 3ª en el que dichos medios reactivos y dicha apoenzima se ponen en contacto con dicho medio líquido como entidades separadas.

10 5ª.- El método de la reivindicación 3ª en el que dichos medios reactivos y dicha apoenzima se ponen en contacto con dicho medio líquido empleando como dicho componente de marcado en el conjugado marcado un resto de una enzima conjugada formado por dicho grupo prostético combinado con dicha apoenzima.

15 6ª.- El método de la reivindicación 1ª en el que la constante de fijación para la asociación de dicha apoenzima y el grupo prostético cuyo resto está comprendido en el conjugado marcado es mayor que aproximadamente 10^6 molar⁻¹.

20 7ª.- El método de la reivindicación 1ª en el que la constante de fijación para la asociación de dicha apoenzima y el grupo prostético cuyo resto está comprendido en el conjugado marcado es mayor que 10^8 molar⁻¹.

25 8ª.- El método de la reivindicación 1ª en el que dicho resto de grupo prostético es un resto de flavina-adenina-dinucleótido, flavina-mononucleótido, o hem.

30 9ª.- El método de la reivindicación 1ª en el que dicho resto de grupo prostético es un resto de flavina-adenina-dinucleótido o hem, y dicha apoenzima con la que se combina aquél es apoglucosa-oxidasa ó apoperoxidasa, respectivamente.

10ª.- El método de la reivindicación 1ª en el

1 que dicho resto de grupo prostético es un resto de flavina-
-adenina-dinucleótido.

5 11ª.- El método de la reivindicación 10ª, en
el que dicha apoenzima con la que se combina dicho resto de
grupo prostético es apoglucosa-oxidasa.

10 12ª.- El método de la reivindicación 1ª, en
el que dicho ligando a determinar es un antígeno o un anti-
cuerpo para el mismo; un hapteno o un anticuerpo para el mis-
mo; o una hormona, vitamina, metabolito o droga, o un recep-
tor o sustancia de fijación para las mismas.

13ª.- El método de la reivindicación 1ª, en
el que dicho ligando es un hapteno de peso molecular entre
100 y 1000.

15 14ª.- El método de la reivindicación 1ª, que
comprende las etapas de: poner en contacto dicho medio lí-
quido con medios reactivos que incluyen (1) un conjugado -
marcado que comprende un grupo prostético orgánico copulado
con dicho ligando o un análogo de fijación del mismo y (2)
una pareja de fijación específica de dicho ligando, produciend
20 do tal contacto una reacción de fijación en la que se forman
una especie química fijada de dicho conjugado marcado en la
que dicho ligando copulado o análogo en dicho conjugado está
fijado a dicha pareja de fijación y una especie química -
libre de dicho conjugado marcado en la que dicho ligando -
25 copulado o análogo en dicho conjugado no está fijado a di-
cha pareja de fijación, siendo la proporción de dicho grupo
prostético en dichas dos especies químicas formada función
de la presencia de dicho ligando en dicho medio líquido; -
poner en contacto la especie química fijada formada o la -

1 especie química libre formada, o ambas, con una apoenzima
capaz de combinarse con dicho grupo prostético para produ-
cir una holoenzima; y determinar la proporción de dicho gru-
5 po prostético en dichas dos especies químicas formadas por
medición de la actividad de holoenzima en las especies quí-
micas con las que se puso en contacto dicha apoenzima.

10 15ª.- El método de la reivindicación 14ª en el
que la aptitud de dicho grupo prostético copulado en el
conjugado marcado para combinarse con dicha apoenzima para
producir un producto que tiene actividad de holoenzima es
diferente cuando dicho conjugado marcado está en dicha es-
pecie química fijada que cuando está en dicha especie quími-
ca libre.

15 16ª.- El método de la reivindicación 15ª del tipo
homogéneo en el que dicha apoenzima se pone en contacto
con dicha especie química fijada y dicha especie química
libre reunidas y dicha actividad de holoenzima se mide en
ellas.

20 17ª.- El método de la reivindicación 14ª del tipo
heterogéneo en el que dicha especie química fijada y dicha
especie química libre se separan físicamente, dicha apo-
enzima se pone en contacto con una de ellas, y dicha acti-
vidad de holoenzima se mide en ella.

25 18ª.- El método de cualquiera de las reivindica-
ciones 14ª a 17ª en el que dicho grupo prostético es fla-
vina-adenina-dinucleótido, flavina-mononucleótido, o hem.

30 19ª.- El método de cualquiera de las reivindi-
caciones 14ª a 17ª en el que dicho grupo prostético es
flavina-adenina-dinucleótido o hem, y dicha apoenzima con
la que se combina es apoglucosa-oxidasa ó apoperoxidasa,

1 - respectivamente.

20^a.- El método de la reivindicación 14^a, en el que dicho grupo prostético es flavina-adenina-dinucleótido.

5 21^a.- El método de la reivindicación 20^a, en el que dicha apoenzima con la que dicho grupo prostético se combina es apoglucosa-oxidasa.

10 22^a.- El método de la reivindicación 21^a, en el que dicho ligando es una hormona de yodotironina del tiroides.

23^a.- El método de la reivindicación 14^a, en el que dicho ligando a determinar es un antígeno o un hapteno y dicha pareja de fijación es un anticuerpo de aquéllos.

15 24^a.- El método de la reivindicación 23^a, en el que dicho ligando es un hapteno de peso molecular entre 100 y 1000.

20 25^a.- El método de la reivindicación 1^a, que comprende las etapas de: poner en contacto dicho medio líquido con medios reactivos que incluyen (1) un conjugado marcado que comprende un grupo prostético orgánico copulado con dicho ligando o un análogo de fijación del mismo, (2) una pareja de fijación específica de dicho ligando, y (3) una apoenzima capaz de combinarse con dicho grupo prostético para producir una holoenzima, produciendo tal contacto una
25 reacción de fijación en la que se forman una especie química fijada de dicho conjugado marcado en la que dicho ligando - copulado o análogo en dicho conjugado está fijado a dicha - pareja de fijación, y una especie química libre de dicho - conjugado marcado en la que dicho ligando copulado o análogo
30 en dicho conjugado no está fijado a dicha pareja de fijación,

1 - siendo la proporción de dicho grupo prostético en dichas
dos especies químicas formadas, función de la presencia
de dicho ligando en dicho medio líquido; y determinar la
proporción de dicho grupo prostético en dichas dos espe-
5 ciec químicas formadas por medición de la actividad de ho-
loenzima en dicha especie química fijada o en dicha espe-
cie química libre, o en ambas.

26ª.- El método de la reivindicación 25ª en el
que la aptitud de dicho grupo prostético copulado en el
10 conjugado marcado para combinarse con dicha apoenzima pa-
ra producir un producto que tiene actividad de holoenzima
es diferente cuando dicho conjugado marcado está en dicha
especie química fijada que cuando está en dicha especie
química libre.

15 27ª.- El método de la reivindicación 26ª del
tipo homogéneo en el que dicha actividad de holoenzima
se mide sin separación de dicha especie química fijada y
dicha especie química libre.

20 28ª.- El método de la reivindicación 25ª del
tipo heterogéneo en el que dicha especie química fijada
y dicha especie química libre se separan físicamente y
dicha actividad de holoenzima se mide en una de ellas.

25 29ª.- El método de cualquiera de las reivindi-
caciones 25ª a 28ª en el que dicho grupo prostético es
flavina-adenina-dinucleótido, flavina-mononucleótido, o
hem.

30 30ª.- El método de cualquiera de las reivindi-
caciones 25ª a 28ª en el que dicho grupo prostético es
flavina-adenina-dinucleótido o hem, y dicha apoenzima con
la que se combina aquél es apoglucosa-oxidasa o apoperoxi-

1 -dasa, respectivamente.

31ª.- El método de la reivindicación 25ª, en el que dicho grupo prostético es flavina-adenina-dinucleótido.

5 32ª.- El método de la reivindicación 31ª, en el que dicha apoenzima con la que se combina dicho grupo prostético es apoglucosa-oxidasa.

10 33ª.- El método de la reivindicación 32ª, en el que dicho ligando es una hormona de yodotiromina del tiroides.

34ª.- El método de la reivindicación 25ª, en el que dicho ligando a determinar es un antígeno o un hapteno y dicha pareja de fijación es un anticuerpo de los mismos.

15 35ª.- El método de la reivindicación 34ª, en el que dicho ligando es un hapteno de peso molecular entre 100 y 1000.

20 36ª.- El método de la reivindicación 1ª, que comprende las etapas de: poner en contacto dicho medio líquido con medios reactivos que incluyen (1) un conjugado marcado que comprende (a) un complejo de un grupo prostético orgánico y una apoenzima que se combinan para formar una holoenzima y (b) dicho ligando o un análogo de fijación del mismo copulado a dicho complejo a través de dicho grupo prostético, y (2) una pareja de fijación específica de dicho ligando, produciendo tal contacto una reacción de fijación en la que se forman una especie química fijada de dicho conjugado marcado en la que dicho ligando copulado o análogo en dicho conjugado está fijado a dicha pareja de fijación y una especie química libre de dicho con-

25

30

1 jugado marcado en la que dicho ligando copulado o análogo
en dicho conjugado no está fijado a dicha pareja de fija-
ción, siendo la proporción de dicho complejo en dichas dos
especies químicas formadas, función de la presencia de di-
5 cho ligando en dicho medio líquido, y determinar dicha pro-
porción por medición de la actividad de holoenzima en di-
cha especie química fijada o en dicha especie química li-
bre, o en ambas.

37ª.- El método de la reivindicación 36ª en el
10 que la actividad de holoenzima de dicho complejo en el
conjugado marcado es diferente cuando dicho conjugado mar-
cado está en dicha especie química fijada que cuando está
en dicha especie química libre.

38ª.- El método de la reivindicación 37ª del ti-
15 po homogéneo en el que dicha actividad de holoenzima se
mide en dicha especie química fijada y dicha especie quími-
ca libre reunidas.

39ª.- El método de la reivindicación 36ª del ti-
20 po heterogéneo en el que dicho complejo tiene actividad de
holoenzima y en el que dicha especie química fijada y di-
cha especie química libre se separan físicamente y dicha
actividad de holoenzima se mide en una de ellas.

40ª.- El método de cualquiera de las reivindi-
caciones 36ª a 39ª en el que dicho grupo prostético es
25 flavina-adenina-dinucleótido o hem, y dicha apoenzima con
la que se combina es apoglucosa-oxidasa ó apoperoxidasa,
respectivamente.

41ª.- El método de cualquiera de las reivindi-
caciones 36ª a 39ª en el que dicho grupo prostético es
30 flavina-adenina-dinucleótido y dicha apoenzima con la que

1 se combina es apoglucosa-oxidasa.

42ª.- El método de la reivindicación 36ª, en el que dicho ligando es una hormona de yodotironina del tiroides.

5 43ª.- El método de la reivindicación 36ª, en el que dicho ligando a determinar es un antígeno o hapteno y dicha pareja de fijación es un anticuerpo de los mismos.

10 44ª.- El método de la reivindicación 43ª, en el que dicho ligando es un hapteno de peso molecular entre 100 y 1000.

45ª.- Un método de ensayo de fijación específico para determinar un ligando en un medio líquido.

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

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

MADRID, 26. FEB. 1980

P.A.

Alberto de Elizaburu
Por Poder.

