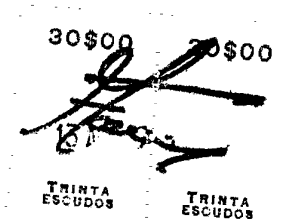


65 198

0A/9470-233

0A/0590-233

PATENTE Nº. 83 194



"Processo de fabrico de um dis
positivo para a realização de
uma determinação imunoquímica"

para que

AKZO N.V., pretende obter pri
vilégio de invenção em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se a um processo de fabrico de um dispositivo para a realização de uma determinação imunoquímica, caracterizado por se prover no topo de pelo menos um suporte, uma abertura, por se aplicar no interior, do dito suporte uma substancia imunoquimicamente activa (SIA 1) por se proverem no topo do dito suporte meios de fecho removíveis e por se aplicar ao dito suporte, pelo menos uma segunda substância imunoquimicamente activa (SIA 2) contida numa partícula sólida, mais ou menos esférica, congelada e seca, preparada antes da SIA 2 ser posta em contacto com a parede interior do suporte ou com a SIA 1, estando a dita SIA 2 na ausência de um meio teste, contida no suporte fechado, numa forma tal que, durante o armazenamento e transporte sob condições normais, não exhibe interacção com o interior do suporte, e é inerte relativamente à substância imunoquimicamente activa nele aplicada.

- 2 -

M E M Ó R I A D E S C R I T I V A

O presente invento refere-se ao processo de fabrico de um dispositivo para a realização de uma determinação imunoquímica compreendendo o dito dispositivo pelo menos um suporte que é fornecido com uma abertura no topo, e dentro do qual é aplicada uma substância imunoquimicamente activa (SIA 1).

Conhecem-se dispositivos deste tipo nos quais a SIA 1, inter alia, é aplicada ao interior do suporte por forma a reduzir o número de operações que têm de ser efectuadas para a realização da determinação imunoquímica. A redução do número de operações é de importância em dois aspectos: em primeiro lugar, para instituições que têm de realizar grandes números da mesma determinação, e em segundo lugar para a determinação "faça você mesmo", onde o número de erros que podem ser cometidos, será menor se o número de operações a serem efectuadas for menor. Estão pois a ser, diligentemente efectuadas, tentativas para desenvolver dispositivos que vão de encontro à necessidade acima mencionada.

De modo a realizar por exemplo uma assim chamada, determinação "Sandwich", é em geral necessário, adicionar ao suporte, além do meio teste, pelo menos também em adição, uma quantidade exactamente conhecida de uma segunda substância imunoquimicamente activa. Depois da incubação e da lavagem deste suporte, a substância a ser determinada, pode então como regra ser determinada quantitativa e qualitativamente. A adição desta segunda substância imunoquimicamente activa em quantidades exactas, fornece uma fonte de erros e, se estão envolvidos números grandes, é laboriosa. Seria pois uma vantagem fornecer um dispositivo cujo(s) suporte(s) contivesse(m) também a dita segunda substância imunoquimicamente activa de modo que a pessoa que realiza a determinação não tivesse de adicionar a dita substância.

A patente E.U. 4017597 fornece uma solução para este problema. A segunda substância imunoquimicamente activa é adicionada a um suporte, revestido com a primeira substância imunoquimicamente acti-

- 3 -

va, na forma dissolvida e subseqüentemente a segunda substância imunoquimicamente activa, é congelada a aproximadamente -78°C durante 5 a 15 segundos e liofilizada. Outro processo, de introduzir a segunda substância imunoquimicamente activa sob a forma de um pó sólido, é considerado possível, mas não prático. Ainda que a referência anterior apresente uma solução para o problema de evitar a necessidade de adição da segunda substância imunoquimicamente activa pela pessoa que efectua uma determinação imunoquímica, um número de desvantagens é também introduzido.

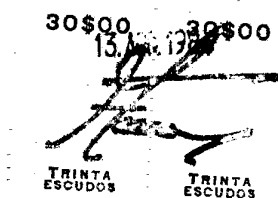
Antes de mais, embora por pouco tempo, a segunda substância imunoquimicamente activa está presente na forma dissolvida no tubo revestido durante algum tempo. Se a primeira substância imunoquimicamente activa é um anticorpo, e a segunda substância imunoquimicamente activa é o correspondente antigénio, ocorrerá alguma interacção. Ocorrerá ainda alguma interacção entre a parede e a segunda substância imunoquimicamente activa.

Em segundo lugar, o arrefecimento de grande número de tubos ou de placas microtitulo a -78°C durante 15 segundos requiere medidas tecnicamente sofisticadas e caras.

Além disso a liofilização de grande número de tubos ou placas microtitulo, requer ainda câmaras de liofilização muito grandes e caras.

O presente invento fornece o processo de fabrico de um dispositivo que evita a necessidade de adicionar a segunda substância imunoquimicamente activa, pela pessoa que efectua a determinação imunoquímica, e os inconvenientes da referência anterior, aplicando uma partícula sólida, mais ou menos esférica, congelada e ^{lio}filizada, que contém a segunda substância imunoquimicamente activa. A dita partícula é preparada antes da segunda substância imunoquimicamente activa ser posta em contacto com a parede interior do tubo ou com a primeira substância imunoquimicamente activa.

Assim o presente invento refere-se ao processo de fabrico de um dispositivo para a realização de uma determinação imunoquímica com



- 4 -

preendendo pelo menos um suporte que é fornecido com uma abertura no topo, e dentro do qual uma substância imunoquimicamente activa é aplicada e que é fechado no topo por meios de oclusão removíveis, contendo o suporte pelo menos uma segunda substância imunoquimicamente activa que, na ausência de meio teste, na forma em que, a dita segunda substância imunoquimicamente activa, está contida no suporte fechado, durante o armazenamento e transporte sob condições normais, não exhibe interacção com o interior do suporte, e é inerte em relação à substância imunoquimicamente activa nele aplicada, caracterizado pelo facto de o suporte conter uma partícula sólida, mais ou menos esférica congelada e seca, que contém a segunda substância imunoquimicamente activa.

Como já foi referido, a partícula é preparada antes da segunda substância imunoquimicamente activa (SIA 2), ser posta em contacto com a parede interior do tubo ou com a primeira substância imunoquimicamente activa (SIA 1). Isto evita os inconvenientes mencionados. Além disso o dispositivo fabricado de acordo com o presente invento exhibe ainda um grau de significância melhorado, o que significa que o limite de detecção do dispositivo fabricado de acordo com o presente invento é melhorado em relação ao dispositivo de acordo com a patente EU 4017597. Se bem que este melhoramento não esteja ainda completamente compreendido, ele é considerado bastante surpreendente.

Foi notado que a selectividade, a sensibilidade e a especificidade das determinações realizadas utilizando o dispositivo fabricado de acordo com a invenção, revelam a mesma qualidade, mesmo depois do armazenamento por longos períodos, que a de um método de determinação utilizando um dispositivo conhecido no qual a SIA 2 é adicionada durante a determinação.

O dispositivo compreende pelo menos um suporte. Se o dispositivo compreende um suporte, o dispositivo pode consistir num tubo de ensaio, no interior do qual se aplica uma SIA 1, e que contém uma segunda SIA, que não exhibe interacção com a parede interior e é inerte em relação à SIA 1, e cujo topo é fechado por meio de uma tampa.

Os tubos de ensaio e tampas deste tipo são conhecidos per se



- 5 -

e podem ser feitos de vidro ou de polímeros sintéticos tais como por exemplo poliestireno. O tubo de ensaio é preferivelmente transparente. Tampa e tubo de ensaio podem ser feitos do mesmo material, mas isto não é de modo algum essencial. A forma e dimensões do tubo de ensaio podem variar entre grandes limites. A forma do tubo de ensaio pode ser rectangular, cónica ou hemiesférica no fundo sendo o tubo, de preferência, hemiesférico no fundo. A altura do tubo pode variar por exemplo de 1cm a 10cm e o diâmetro interior de 0,3 a 5cm e preferivelmente de 0,5 a 3cm. A tampa pode ser montada no tubo de ensaio do modo conhecido per se, desde que o método de montagem seja tal, que a tampa seja removível e que a tampa feche o tubo de ensaio de modo hermético.

De modo muito adequado o dispositivo pode também conter vários suportes sendo possível que o seu número varie entre largos limites, por exemplo de 2 a 1000 e preferivelmente de 10 a 500, e em particular de 25 a 200. Os suportes podem, muito apropriadamente, ser ligados entre si utilizando o mesmo material de que os próprios suportes, são feitos. No que diz respeito ao material, aplica-se o mesmo, já anteriormente descrito, para um dispositivo com um suporte. Aqui também as dimensões dos suportes podem variar entre grandes limites. Em geral as dimensões dos ditos suportes serão menores do que se o dispositivo compreender um só suporte. A altura pode variar de 0,2 a 4cm e preferivelmente de 0,3 a 2cm, e o diâmetro interior de 0,3 a 2cm, preferivelmente de 0,4 a 1,0cm. Um dispositivo com vários suportes bastante apropriado, é a chamada placa microtitulo em que cada suporte é vedado por um meio de fecho separado. É utilizada, de preferência, uma placa microtitulo fornecida com meios de fecho ligados entre si. Um meio apropriado para este propósito é uma placa com uma guarnição que se projecta por 1 a 3mm e fecha os suportes de modo hermético. Em particular uma placa com guarnição em borra de silicone pode ser apropriadamente utilizada para este propósito.

A parede interna do suporte ou suportes é fornecida com uma substância imunoquimicamente activa (SIA 1) que é nela aplicada de



- 6 -

modo conhecido per se, tal como por meio de acoplamento covalente ou adsorção. Isto pode ser feito apropriadamente introduzindo uma solução ou suspensão de SIA 1 no(s) suporte(s) e, depois de algum tempo, por exemplo 3-24 horas, removendo a solução ou suspensão do suporte. Como resultado da adsorção, a SIA 1 ficará para trás, aderindo à parede interior do(s) suporte(s). Em geral, não mais do que 80% da superfície da parede interior do(s) suporte(s) compreenderá SIA 1, de modo a evitar que a SIA 1 se despegue da parede interior do(s) suporte(s) por acção dos meios de fecho, aquando do fecho.

Se o dispositivo compreender vários suportes, a parede interior dos suportes pode ser provida com SIA 1 e todos os suportes podem conter SIA 2; isto não é porém necessário. Pode ser vantajoso que o dispositivo contenha um ou alguns suportes sem SIA 1 ou SIA 2, ou SIA 1 e SIA 2, ou uma sua combinação em que possam ser realizadas determinações teóricas. Para determinações de calibração alguns suportes podem conter em adição à partícula contendo SIA 2, uma partícula sólida, mais ou menos esférica, liofilizada, contendo a substância a ser determinada.

A SIA 2 deverá estar contida nos suportes numa forma tal que não ocorra interacção, quer com o interior dos suportes, quer com a SIA 1, durante o armazenamento e transporte sob condições normais. Para este fim a SIA 2 é tratada antes de ser posta em contacto com a parede interior do suporte e com a SIA 1. É ainda de importância para dispositivos deste tipo que, quantidades rigorosamente conhecidas de substância imunoquimicamente activa estejam presentes. As partículas contidas nos suportes do dispositivo de acordo com o presente invento são formadas deixando cair em queda livre uma gota de uma solução ou suspensão aquosa de SIA 2, tendo a gota um volume exactamente conhecido e reprodutível, de preferência de 0,025-0,070ml, através de um líquido frio, imiscível com água, que tem uma densidade menor do que a da água, recolher as partículas congeladas na superfície do fundo do líquido frio, e liofilizar. Deste modo, são obtidas partículas sólidas estáveis, mais ou menos esféricas, que contêm uma quantidade rigorosamente conhecida e reprodutível de SIA 2 preferi-

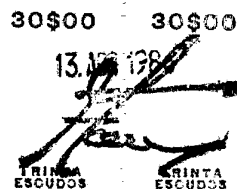
velmente com um diâmetro de 3,6-5,2mm. "Mais ou menos esférica", significa aqui, a forma que é obtida deixando cair uma gota de água através de um líquido que congela a gota.

É vantajoso adicionar à solução ou suspensão aquosa de SIA 2, uma substância que transmita firmeza às partículas liofilizadas, i. e. , um reforçador, por exemplo açúcares tais como a sacarose, manose, lactose e o manitol, e produtos proteínaceos tais como a proteína de soro, hidrolisato de lactalbumina e hidrolisato de caseína. A partícula correspondente conterá o reforçador.

Como líquidos imiscíveis com água, podem ser utilizados um hidrocarboneto ou hidrocarboneto halogenado, ou uma sua mistura, tal como hexano, clorofórmio, heptano, isó-octano, tolueno, misturas hexano-clorofórmio e misturas benzeno-clorofórmio, ou líquidos criogênicos tais como azoto líquido ou oxigênio líquido. Na superfície do fundo da coluna de líquido, a temperatura do líquido que não é miscível com água, está preferivelmente abaixo de -50°C .

Na forma em que a SIA 2 está contida no suporte selado, a SIA 2 não deverá, na ausência do meio de ensaio, exibir interação com a parede interior do suporte, e ser inerte em relação à SIA 1, durante o armazenamento e transporte do dispositivo, sob condições normais. Neste contexto "não exibir interação" e "inerte" significam não haver ligação ou haver ligação de qualquer forma, com a parede interior do suporte ou com a SIA 1, apenas numa extensão tal que a qualidade das determinações realizadas com o dispositivo de acordo com a invenção não experimentem qualquer efeito apreciavelmente adverso em sua consequência. "Condições normais" significam aquelas condições que são usuais para armazenamento e transporte de dispositivos comparáveis, conhecidos. Em geral, uma temperatura de -25°C a $+37^{\circ}\text{C}$ e preferivelmente de -20°C a 20°C à pressão atmosférica será mantida durante o armazenamento e transporte.

A fim de aumentar ainda mais a qualidade das determinações realizadas com o dispositivo, este é seco sem meios de selagem e SIA 2; então as partículas sólidas, liofilizadas, mais ou menos esféricas,



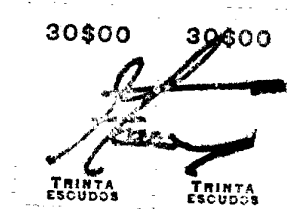
- 8 -

que contêm a SIA 2, são introduzidas nos suportes preferivelmente numa câmara seca, e finalmente os suportes são selados de modo hermêtico com meios de selagem, também preferivelmente numa câmara seca.

O sistema teste terá muitas vezes de ser tamponado durante um teste. Para este fim o(s) suporte(s) do dispositivo de acordo com a invenção, pode apropriadamente conter uma partícula liofilizada, mais ou menos esférica que contém material tampão, e é preparada do mesmo modo que a partícula SIA 2. A maior preferência porém, é por uma partícula preparada a partir de uma solução ou suspensão aquosa de SIA 2, que contém uma quantidade adequada do material tampão desejado. A partícula SIA 2, liofilizada, mais ou menos esférica, contém então também material tampão.

O(s) suporte(s) do dispositivo de acordo com a invenção, podem apropriadamente conter várias substâncias imunoquimicamente activas (SIA 3, SIA 4, etc.) desde que as ditas substâncias satisfaçam o critério que a SIA 2 tem de satisfazer, e desde que as substâncias na forma em que são introduzidas sejam também inertes em relação umas às outras e à SIA 2 sob as circunstâncias já descritas. As SIA 3, SIA 4, etc., são preferivelmente tratadas do mesmo modo que a SIA 2, obtendo-se as partículas SIA 3, SIA 4, etc., liofilizadas, mais ou menos esféricas. Um processo de teste em que o dispositivo de acordo com a invenção com suportes que contêm uma partícula SIA 2 e uma SIA 3, pode apropriadamente ser utilizado, é o teste de inibição em que a SIA 3 contém uma substância que é imunologicamente equivalente à, ou imunologicamente complementar da, substância imunoquimicamente activa que se deseja determinar. Noutros processos de teste nos quais o dispositivo de acordo com a invenção pode ser utilizado, tais como o teste "Sandwich" e o teste competitivo, uma única partícula SIA 2 é suficiente.

Com o dispositivo de acordo com a invenção, dependendo da SIA 1 e SIA 2 (e possivelmente SIA 3) e dependendo do processo de teste escolhido, podem ser determinados anti-corpos, antígenos e haptenos.



- 9 -

No teste "Sandwich", a SIA 1 e SIA 2 são anti-corpos se se tem de determinar um antigénio, e são antigénios ou anti-anticorpos se se tem de determinar um anti-corpo. A SIA 1 e SIA 2 podem ser ambas anticorpos policlonais e monoclonais, desde que a SIA 1 e SIA 2 sejam anticorpos monoclonais contra o antigénio que tem de ser determinado, os anticorpos-SIA 1 devem ser muitas vezes dirigidos contra um antigénio determinando outro que não os anticorpos SIA 2. Se a substância a ser determinada tem dois ou mais determinantes antigénicos idênticos, ou se a substância a ser determinada, ainda que ela própria não possua dois determinantes idênticos, esteja presente no meio teste na forma de colónia, de tal modo que a colónia tenha dois ou mais determinantes antigénicos, podendo a SIA 1 e SIA 2 ser anticorpos monoclonais dirigidos contra o mesmo determinante antigénico.

No teste competitivo, a SIA 2 é um antigénio ou hapteno se a SIA 1 é um anticorpo monoclonal ou policlonal, enquanto que a SIA 2 é um anticorpo monoclonal ou policlonal se a SIA 1 é um antigénio ou hapteno.

Se a SIA 1 é um anticorpo monoclonal ou policlonal no teste de inibição, a SIA 2 deveria também ser um anticorpo monoclonal ou policlonal e a SIA 3 um antigénio, enquanto que a SIA 2 deveria ser um antigénio ou hapteno e a SIA 3 um anticorpo se a SIA 1 é um antigénio ou hapteno. Aqui a preferência anteriormente mencionada também se aplica se a SIA 1 e SIA 2 são anticorpos monoclonais.

De modo a tornar a detecção, possível, a SIA 2 deverá ser fornecida com uma substância marcadora ou depois da incubação com o meio teste e lavagem do suporte, deverá ser posta em contacto com uma substância que se ligue à SIA 2 e que é fornecida com uma substância marcadora. Preferivelmente a SIA 2 é ela própria fornecida com uma substância marcadora. A substância marcadora pode ser um isótopo ou uma enzima corante, substância fluorescente, metal solúvel ou corante solúvel, ligados à SIA 2.

Um processo de determinação imunoquímica utilizando o dispositivo de acordo com a invenção, é geralmente realizado como se segue.



- 10 -

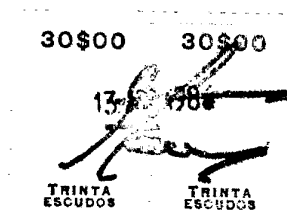
Ao suporte é adicionado liquido teste depois dos meios de selagem terem sido removidos. Realiza-se então a incubação durante algum tempo. Depois da incubação, o líquido é removido e o suporte é lavado após o que o resultado do teste pode ser determinado se a substância marcadora é um isótopo, corante, substância fluorescente, ou partícula metálica. Se a substância marcadora é uma enzima, deverá ser adicionado também substrato que seja convertido pela enzima numa substância detectável.

Com o dispositivo de acordo com a invenção podem ser realizadas determinações imunoquímicas, que em relação à especificidade, sensibilidade e selectividade, não são secundárias em relação a determinações realizadas com dispositivos aos quais a SIA 2 e possivelmente SIA 3 são adicionadas durante, ou pouco tempo antes da determinação, mesmo que o dispositivo de acordo com a invenção tenha sido armazenado durante meses. O presente invento é explicado com mais detalhe com referência aos seguintes exemplos.

Exemplo 1

De quatro placas microtitulo de poliestireno contendo 8 filas de 12 suportes conicamente cilindricos (altura 10mm, diâmetro superior 6,5mm, diâmetro inferior 6,0mm) com um fundo chato, alguns suportes foram cheios com 0,135ml de uma solução aquosa que continha SIA 1. Depois de 16 horas, o liquido foi removido e as placas microtitulo foram secas durante 24 horas a 20°C em ar com uma humidade relativa

<20%. As placas microtitulo 1 e 2 foram imediatamente utilizadas para algumas determinações nas quais, depois de o meio teste ter sido adicionado aos suportes, se adicionava aos suportes da placa microtitulo 1, uma gota de uma solução aquosa de SIA 2, e se adicionava aos suportes da placa microtitulo 2 uma partícula contendo SIA 2, preparada como a seguir é descrito partindo de uma gota com o mesmo volume e a mesma concentração de SIA 2 que a gota que ^{foi} adicionada aos suportes da placa microtitulo 1. Aos suportes das placas microtitulo 3 e 4 foram adicionadas partículas contendo SIA 2, numa câmara seca, também preparadas como a seguir é descrito, partindo de uma gota com o mesmo volume e a mesma concentração da gota que foi adicionada aos



- 11 -

suportes da placa microtitulo 1. A alguns suportes foram também adicionadas particulas contendo SIA 3. As placas microtitulo 3 e 4 foram então seladas na mesma camara seca com meios de selagem com guarnições projectando 2,5mm de borracha de silicone que fecharam os suportes das placas microtitulo de modo hermético e armazenadas durante uma semana ou 3 meses respectivamente a 18°C e à pressão atmosférica.

De uma solução que continha uma quantidade rigorosamente conhecida de SIA 2, tampão e sacarose, foram retiradas gotas de 0,05ml, utilizando um pipeta de gota, em queda livre, através de um balão Dewar cheio com 80cm de azoto liquido. No fundo, as particulas sólidas, mais ou menos esféricas, foram juntas e liofilizadas. Estas particulas foram usadas nos suportes das placas microtitulo 2, 3 e 4. As particulas que continham SIA 3 foram preparadas do mesmo modo.

As determinações foram realizadas como se segue. Depois de o meio teste, que continha uma quantidade rigorosamente conhecida de substância a ser determinada ter sido adicionada, realizou-se a incubação durante algum tempo a 37°C; seguiu-se a lavagem com tampão e detecção. Se for utilizada uma enzima (peroxidase) como substância marcadora, realizar-se-á um passo de incubação adicional usando um substrato contendo peróxido, antes da detecção. A detecção ocorreu nos vários exemplos de um modo colorimétrico.

Os exemplos 1, 4, 7, 10 em que foi determinado o HBsAg, foram realizados de um modo idêntico tendo em conta que, foram usadas no exemplo 1 uma gota de liquido contendo SIA 2 e nos exemplos 4, 7 e 10 particulas contendo SIA 2, fazendo variar o tempo depois do qual o teste era realizado após a adição das particulas aos suportes. O mesmo se aplica aos Grupos exemplo 2, 5, 8, 11 e 3, 6, 9, 12 em que foram determinadas HCG e testosterona respectivamente. Cada um dos exemplos foi realizado 10 vezes; a quantidade obtida, que se mostra na última coluna da tabela 1, é a média destas 10 determinações.

Como será evidente dos resultados a qualidade das determinações realizadas com o dispositivo de acordo com a invenção é a mesma das determinações realizadas com dispositivos conhecidos. O disposi-

65 198
0A/9470-233
0A/0590-233

30\$00 30\$00

TRANT
RECUBOS

- 12 -

tivo de acordo com a invenção tem ainda a vantagem de a pessoa que tem de realizar a determinação não ter de adicionar uma quantidade rigorosamente conhecida de SIA 2 ao(s) suporte(s).

TABELA 1

Exemplo	placa micro tftulo	SIA1	SIA2	Substância marcadora	Tipo de teste	Meio de teste	SIA3	Tempo de incu- bação	Quantidade de obtida
1	1	M anti-HBs	anti-HBs	enzima	Sandwich	0,1 ml soro	N.A.	1 h.	1,0 ng/ml
2	1	HCG	anti-HCG	ouro solúvel	competitiva	0,1 ml urina	N.A.	1 h.	1010 IU/l
3	1	anti-T	anti-T	corante	inibição	0,1 ml PBS	T-BSA (adicio nada na forma de gota)	2 h.	250 ng/ml
4	2	M anti-HBs	anti-HBs	enzima	Sandwich	0,1 ml soro	N.A.	1 h.	1,0 ng/ml
5	2	HCG	anti-HCG	ouro solúvel	competitiva	0,1 ml urina	N.A.	1 h.	1012 IU/l
6	2	anti-T	anti-T	corante	inibição	0,1 ml PBS	T-BSA	2 h.	252 ng/ml
7	3	M anti-HBs	anti-HBs	enzima	Sandwich	0,1 ml soro	N.A.	1 h.	1,0 ng/ml
8	3	HCG	anti-HCG	ouro solúvel	competitiva	0,1 ml urina	N.A.	1 h.	980 IU/l
9	3	anti-T	anti-T	corante	inibição	0,1 ml PBS	T-BSA	2 h.	245 ng/ml
10	4	M anti-HBs	anti-HBs	enzima	Sandwich	0,1 ml soro	N.A.	1 h.	1,0 ng/ml
11	4	HCG	anti-HCG	ouro solúvel	competitiva	0,1 ml urina	N.A.	1 h.	1013 IU/l
12	4	anti-T	anti-T	corante	inibição	0,1 ml PBS	T-BSA	2 h.	257 ng/ml

PBS = solução salina tamponada com fosfato
HBsAg = Antígeno de superfície de hepatite B
Anti-HBs = Anticorpo (ovino) contra o HBsAg
M anti-HBs = Anticorpo monoclonal (ratinho) contra o HBsAg
HCG = Gonadotrofina do corion humano
Anti-HCG = Anticorpo (coelho) contra HCG
T = Testosterona
Anti-T = Anticorpo (coelho) contra a T
T-BSA = várias moléculas T acopladas a uma molécula de albumina de soro de bovino
N.A. = Não aplicável



- 14 -

Exemplo 2

Vinte e três suportes de duas placas microtitulo, foram revestidos com M-anti-HBsAg como no exemplo 1. Subsequentemente, adicionaram 0,050ml de uma solução aquosa que continha anti-HBsAg, marcada com uma peroxidase, aos suportes revestidos de uma placa microtitulo, a 0°C. A solução foi congelada em 15 segundos, a -78°C, e depois a placa microtitulo foi liofilizada durante 16 horas. Adicionou-se aos suportes revestidos da outra placa microtitulo, uma partícula contendo anti-HBsAg, marcada com uma peroxidase e preparada como no exemplo 1. Realizaram-se depois os imuno-testes de enzimas em ambas as placas microtitulo com 19 soros humanos diferentes, que não continham HBsAg, e duas vezes com soros contendo 0,1 U/ml e 1,0 U/ml de HBsAg, respectivamente. O ensaio e detecção foram realizados como no exemplo 1.

O nível de significância foi calculado a partir da fórmula $\frac{X-Y}{Z}$ onde X = média dos valores medidos para os soros contendo 0,1 ou 1,0 U HBsAg/ml, Y = média dos valores medidos para os soros que não continham HBsAg, e Z = desvio padrão de Y.

Na tabela 2 são dados os resultados que mostram claramente que o limite de detecção é menor para o dispositivo de acordo com a invenção do que para o dispositivo de acordo com a patente E.U. 4017597 (quanto maior o nível de significância menor o limite de detecção).

TABELA 2

	0,1 U HBsAg/ml	1,0 U HBsAg/ml
Invento	8	88
USP 4,017,597	3	41

U/ml são unidades de HBsAg como definidas pelo Paul Ehrlich Institute (Frankfurt RFA) por ml

- 15 -

REIVINDICAÇÕES

1a. - Processo de fabrico de um dispositivo para a realização de uma determinação imunoquímica, caracterizado por se prover no topo de pelo menos um suporte, uma abertura, por se aplicar no interior, do dito suporte uma substância imunoquimicamente activa (SIA 1) por se proverem no topo do dito suporte meios de fecho removíveis e por se aplicar ao dito suporte, pelo menos uma segunda substância imunoquimicamente activa (SIA 2) contida numa partícula sólida, mais ou menos esférica, congelada e seca, preparada antes da SIA 2 ser posta em contacto com a parede interior do suporte ou com a SIA 1, estando a dita SIA 2 na ausência de um meio teste, contida no suporte fechado numa forma tal que, durante o armazenamento e transporte sob condições normais, não exhibe interacção com o interior do suporte, e é inerte relativamente à substância imunoquimicamente activa nele aplicada.

2a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a partícula conter também material tampão.

3a. - Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo facto de a partícula conter também um reforçador.

4a. - Processo de fabrico de um dispositivo de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo facto de nele se incluir um só suporte.

5a. - Processo de fabrico de um dispositivo de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo facto de nele se incluírem 2 a 1000 suportes.

6a. - Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo facto de o dispositivo incluir ainda uma placa de microtítulo.

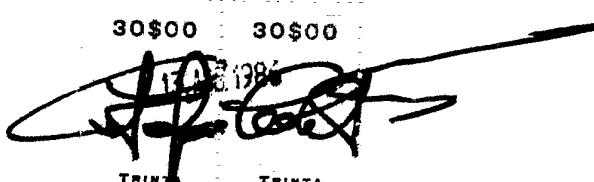
7a. - Processo de acordo com as reivindicações 5 ou 6, caracterizado por se fornecerem meios de fecho que consistem numa placa provida de tampas que selam os suportes.

65 198
0A/9470-233
0A/0590-233

- 16 -

LISBOA, 13.10.1984

Pela AKZO N.V.
O AGENTE OFICIAL

30\$00 30\$00
13.10.1984

TRINTA ESCUDOS TRINTA ESCUDOS