

## **La Difusión en la reacción Antígeno – Anticuerpo\***

PEREA FALOMIR, M.; PEREZ PLA, F.; MORENO FRIGOLS, J.L.  
*Departamento Química Física. Facultades de Farmacia y Química  
de Valencia.*  
*Servicio de Radioisótopos. Hospital Clínico Universitario de  
Valencia*

### RESUMEN

En trabajos realizados anteriormente se ha observado indicios sobre la importancia de la difusión molecular en la reacción antígeno-anticuerpo. Para el tratamiento de los resultados se utilizaron exclusivamente ajustes polinómicos, los cuales tienen la ventaja de su sencillez y generalidad, pero son poco informativos en cuanto a las características inherentes al proceso.

En el presente trabajo se partió de los resultados obtenidos en varias series de experiencias tendentes al estudio de la cinética de distintas reacciones antígeno anticuerpo. En la mayor parte de ellas, se utilizaron antígenos marcados con  $I^{125}$  y en algunos casos, anticuerpos con este mismo radionúclido. En todos los casos se siguió el curso de la reacción midiendo la radiactividad del inmunocomplejo Ag-Ac formado a diferentes tiempos, directamente proporcional a su concentración, por lo que los datos de partida son siempre tablas: Actividad, en cuentas por minuto (CPM), representada por A, frente al tiempo (t) en minutos.

Los resultados obtenidos para un total de dieciséis reacciones se analizan utilizando exclusivamente el método integral mediante los modelos de Stenberg y Karlsson, cada uno de los cuales suministra una ecuación de velocidad integrada que ha sido adaptada para aplicarla a los valores disponibles. Se encuentra control por difusión en un elevado tanto por ciento de los casos estudiados.

---

\* Conferencia pronunciada por el Dr. José Luis Moreno Frigols en la sesión científica celebrada el 14 de enero de 1999

**Palabras clave:** Difusión.- Antígeno.- Anticuerpo.

## SUMMARY

### **Diffusion in the antigen - antibody reaction**

In previous works some indications about the importance of molecular diffusion in the antigen-antibody reaction have been reported. Polynomic plots were used for the analysis of the results; They have the advantage of being simple, but the drawback of not giving very much information concerning the characteristics of the process.

In this work the results obtained in several series of kinetics of antigen-antibody experiences were used. In most of them the antigen was labelled with  $I^{125}$  and in some cases it was the antibody, with the same radionuclide. In all cases the reaction was followed by measuring the radioactivity of the Ag-Ab immunocomplex produced in different times. This signal is directly proportional to the concentration, so the original data are presented as Activity (represented by A) in CPM vs time (t) in minutes.

The results obtained for sixteen reactions were analyzed using exclusively the integral method by means of both Stenberg and Karlsson models. Each one gives an integrated velocity equation that was adapted in order to be applied to the data. A Diffusion control was found in a high percentage of the studied cases.

**Keywords:** Diffusion.- Antigen.- Antibody.

## INTRODUCCIÓN

### **Técnicas inmunoanalíticas: Radioinmunoanálisis (RIA)**

En el terreno bioquímico-fisiológico es frecuente la existencia de sustancias cuyas concentraciones en los fluidos biológicos son demasiado bajas para ser detectadas por los métodos espectrofotométricos. Además, muchas de ellas se encuentran mezcladas con otras de estructura muy semejante, por lo que su determinación analítica suponía un doble reto, ya que se necesitaba una técnica de gran sensibilidad y especificidad. En los años 60 Yallow y Berson resolvieron el problema poniendo a punto, para la valoración de la insulina, un método que combina la capacidad de la radioquímica para la detección de cantidades muy pequeñas, con la cualidad de distinguir selectivamente entre compuestos muy parecidos, característica de las reacciones antígeno-anticuerpo.

Acudamos a las fuentes: “El principio del radioinmunoanálisis se expresa por reacciones competitivas. El antígeno no marcado, presente en la muestra problema, compete frente el antígeno marcado (“trazador”), por unirse al anticuerpo y, por tanto, disminuye el enlace de antígeno marcado. El grado de inhibición competitiva observado en la muestra problema se compara con el obtenido en disoluciones patrón para la determinación de antígeno en los problemas. El radioinmunoanálisis fue originalmente usado para la medida de insulina plasmática y, desde entonces, ha sido aplicado a muchas otras hormonas peptídicas y otras sustancias.

La extensión del principio del radioinmunoanálisis a sistemas no inmunológicos y no hormonales puede ser expresado por el más general término “radioanálisis competitivo”, aunque dicho término no es completamente satisfactorio, puesto que el principio es aplicable al uso de “marcadores” distintos de los trazadores radioisotópicos, aunque solamente los últimos han sido empleados hasta ahora. Herbert y otros demostraron la aplicabilidad del radioanálisis competitivo a la medida de la vitamina B12 en homogeneizados de hígado, usando factor intrínseco como reactor específico, y Rothenberger, en nuestro laboratorio, y Barakat y Ekins en Londres, desarrollaron métodos analíticos para la vitamina B12 sérica, usando el mismo principio. Rothenberger, más tarde, midió ácido fólico usando fólico reductasa como reactor específico. Ekins ha determinado tiroxina y Murphy, en Montreal, tiroxina y hormonas esteroides, usando el enlace específico a proteínas plasmáticas como reactores específicos. Una más reciente aplicación ha tenido lugar en la detección y medida de RNA mensajero específico, usando DNA de secuencias complementarias como reactor específico. La reacción de RNA con DNA sirve como contrapartida de la reacción antígeno-anticuerpo”.

Hasta aquí, la cita literal de un artículo (28) en el que los propios autores, galardonados posteriormente con el Premio Nobel, exponen el espíritu de la técnica desarrollada por ellos .

### **Análisis inmunoradiométrico (IRMA)**

“Con objeto de mejorar los métodos de análisis con respecto a la sensibilidad y precisión, es necesario considerar algunas características generales de los procedimientos analíticos que optimizan estas cualidades. La mayor parte de las técnicas incluyen la conversión de la sustancia problema en un producto que pueda ser observado directamente. Para la máxima sensibilidad se requieren dos condiciones. En primer lugar, una máxima conversión molar de problema en producto (la sensibilidad puede aumentarse por procedimientos cíclicos que den como resultado la conversión de una molécula de problema en varias moléculas de producto). En segundo lugar, la propiedad ensayada debe ser detectable con gran sensibilidad. Considerado a la luz de otros procedimientos analíticos, el radioinmunoanálisis es muy peculiar, ya que proporciona un método indirecto de medida del analito, convirtiéndolo, parcialmente en un complejo antígeno-anticuerpo. La cantidad de este complejo es estimada indirectamente por su efecto en reducir la cantidad de complejo formado entre el antígeno marcado, y el anticuerpo. Este procedimiento presenta algunas desventajas teóricas y prácticas:

1. Las hormonas polipeptídicas marcadas han de ser alteradas más o menos severamente para introducir el trazador.

2. Una proporción variable, y a menudo grande, del problema queda sin reaccionar, lo cual reduce la sensibilidad.

3. Para obtener competición entre hormona marcada y no marcada en radioinmunoanálisis, la concentración de anticuerpo es reducida hasta que es solamente suficiente para unir, en ausencia de hormona no marcada, aproximadamente la mitad de la hormona marcada presente. Esto tiene dos importantes implicaciones:

Los cambios en la hormona no marcada se observan frente a un alto fondo de radiactividad.

La concentración de anticuerpo debe ser reducida a un nivel inferior a la del antígeno. Por lo tanto, a no ser que el anticuerpo tenga una muy alta afinidad, el equilibrio de la reacción antígeno-anticuerpo impedirá que se alcance una sensibilidad grande.

4. Las gráficas de calibración en radioinmunoanálisis no son lineales con respecto al efecto de la concentración de antígeno frente a la radiactividad, sino que, más frecuentemente, muestran una relación lineal entre el logaritmo de la concentración y la radiactividad. Esto limita la precisión con que pueden medirse pequeños cambios porcentuales en la concentración de antígeno.

Teóricamente, la mejor vía para el uso de anticuerpos en el análisis de antígenos, es conseguir que el anticuerpo convierta todo el antígeno en un producto detectable, que pueda medirse directamente. Debe ser posible medir cantidades muy pequeñas de complejo antígeno-anticuerpo, si el anticuerpo estuviera marcado, pero sólo si es posible separar el complejo del anticuerpo libre”.

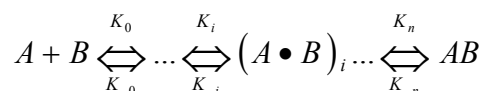
Las consideraciones anteriores, debidas a Miles y Hales (9), representan una evidente crítica del radioinmunoanálisis y suponen el punto de arranque de la modificación conocida como análisis inmunoradiométrico (IRMA). En ella se hace reaccionar el antígeno presente en la muestra con un anticuerpo marcado, y se mide la radiactividad del complejo antígeno-anticuerpo, que, lógicamente, aumenta con la concentración de antígeno. Como puede verse, la diferencia fundamental entre RIA e IRMA consiste en que el trazador radiactivo es el antígeno en el primero y el anticuerpo en el segundo. La separación de anticuerpo libre y ligado al antígeno suele realizarse por adsorción del complejo sobre una fase sólida y lavado de la fracción libre.

Las técnicas radioinmunoanalíticas han gozado de una amplia difusión en las últimas décadas, aún con los condicionamientos inherentes a la utilización de radiactividad, que limita su utilización a laboratorios autorizados. Por otra parte, se ha querido ver en ellas un componente de peligrosidad más teórico que real, ya que las actividades utilizadas son bajísimas.

### **Cinética de la reacción antígeno-anticuerpo**

La interacción Ag-Ac se conoce como una reacción bimolecular específica y muy rápida, lo que hace pensar en un posible control por difusión para la reacción global (11) (19) (24) (26). Además, elevadas

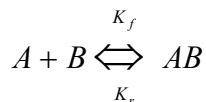
concentraciones de sitio receptor libre provocan una mayor velocidad de reacción del sistema, agotando el sustrato en sus proximidades y obligando posteriormente a los ligandos a difundir distancias macroscópicas hasta alcanzar la vecindad del reactor. Por tanto la interacción Ag Ac puede describirse de acuerdo a la fórmula:



Aquí  $k_i$  son las diferentes constantes de velocidad de reacción directa,  $k_{-i}$  son las diferentes constantes de velocidad de reacción inversa y AB es el complejo final formado después de n diferentes estados intermedios  $(A \bullet B)_i$ .

Para reactivos multivalentes A o B, el intermediato  $(A \bullet B)_i$  podría representar estados con diferente número de enlaces múltiples.

Un camino para considerar control por difusión es el de identificar el estado intermedio inicial  $(A \bullet B)_0$  como complejo de encuentro, el cual, debe formarse antes de que la reacción pueda continuar. En este caso, la constante de velocidad  $k_0$  representa la constante de velocidad de difusión con la cual los dos reactivos son posicionados o estereodirigidos apropiadamente para la reacción. Esto podría conllevar ambas difusiones traslacional y rotacional. Consecutivamente la constante de velocidad  $k_{-0}$  representa la constante de difusión inversa con la que puede disociarse el complejo de encuentro. En el esquema de este tipo de reacción las diferentes constantes de velocidad de reacción son probablemente muy diferentes en magnitud. Normalmente ambas constantes de velocidad de reacción global, tanto directa como inversa, están limitadas por una constante de velocidad particular y el esquema de reacción global puede ser simplificado a:



Donde  $k_f$  es la constante de velocidad de reacción directa (forward) o de asociación, y  $K_r$  es la constante de velocidad de reacción inversa (reverse) o de disociación.

Al considerar los estados intermedios como cuasi estacionarios, se pueden obtener expresiones simplificadas para las constantes de velocidad de reacción global. Este procedimiento para reducir un esquema de reacción complicado ha sido utilizado en muchos estudios, por ejemplo al analizar las uniones bivalentes y también al estudiar las reacciones en superficie celular.

### OBJETIVOS

Muchos métodos inmunológicos de rutina están basados en las reacciones inmunoquímicas realizadas en la interfase sólido-líquido, debido principalmente a que los métodos en fase sólida proporcionan modos simples de separación de reactivos libres y unidos. Estos métodos también son conocidos por su sensibilidad y pueden ser utilizados con diferentes técnicas de medida de análisis en superficie.

Las características de sensibilidad y especificidad exigidas a la técnica inmunoanalítica descansan sobre las propiedades cinéticas y de equilibrio inherentes a la reacción antígeno-anticuerpo, sobre las que hemos establecido una línea de investigación que comenzó al observar los resultados obtenidos en el estudio del efecto de la temperatura sobre la velocidad de una de estas reacciones: el clásico ajuste de  $\ln k$  vs  $1/T$  para la ecuación de Arrhenius daba, en algunos casos, un coeficiente de correlación próximo a cero. : Se trata de reacciones con baja energía de activación en las que la influencia de la temperatura es muy poco marcada, y además es lógico que sea así, ya que el antígeno y el anticuerpo son sustancias destinadas a reaccionar específicamente entre ellas, y por tanto cabe esperar que no presenten grandes exigencias en cuanto a la necesidad de activarse: lo que necesitan es encontrarse. En pocas palabras, es la difusión el fenómeno que controla el proceso. Si estas reacciones están controladas por difusión, el Ag que difunde abriéndose paso a través de las moléculas de disolvente acuoso que se oponen a su movimiento tan sólo tendrá que superar el umbral de energía de flujo viscoso del disolvente, correspondiente a la ecuación de Guzmán. Cuando las moléculas de reactivos se encuentren, su separación estará impedida o dificultada por la “jaula” de moléculas de disolvente que las

rodean, debiendo reaccionar al cabo de un número más o menos grande de colisiones.

En los primeros trabajos realizados se utilizaron exclusivamente ajustes polinómicos para el tratamiento de los resultados (1) (2) (3) (6) (7). Tales ajustes tienen la ventaja de su sencillez y generalidad, pero son poco informativos en cuanto a las características intrínsecas del proceso. En una fase posterior, Perea Falomir (16) ha analizado los resultados mediante dos diferentes modelos no excluyentes descritos en la bibliografía, cada uno de los cuales suministra una ecuación de velocidad integrada que hemos adaptado para aplicarla a ellos. Aunque son más complejos y plantean dificultades de manipulación, resultan ser potentes por el bajo número de parámetros a ajustar y flexibles por llevar incluidas tanto la difusividad como la reactividad, proporcionando una abundante información en el comportamiento de las reacciones caracterizadas por estas variables. Se trata de los modelos de Stenberg y Karlsson (23) (8).

Resumiendo, el objetivo principal es :

*La caracterización cinética de algunas reacciones Ag-Ac, en cuanto al control por difusión externa, aplicando diferentes modelos no excluyentes que describan el proceso de unión.*

## MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos partido de los resultados obtenidos en varias series de experiencias, en la mayor parte de las cuales se utilizaron antígenos marcados con  $^{125}\text{I}$  y en algunos casos, anticuerpos con este mismo radionúclido. El curso de las reacciones se siguió midiendo la radiactividad del inmunocomplejo Ag - Ac formado a diferentes tiempos. De las experiencias antes citadas se han recogido las tablas con pares de valores actividad- tiempo. La variable dependiente, representada por A, es la actividad medida en cuentas por minuto correspondiente a la emisión radiactiva del complejo Ag-Ac, más ciertas cuentas inespecíficas cuya cuantía corresponde a la ordenada en el origen de las curvas directas de optimización, y la independiente es el tiempo medido en minutos. Los modelos de Stenberg y Karlsson fueron programados en su día por Pérez Pla, con la aplicación Borland C++, con el fin de que se dispusiera de una



herramienta de análisis para los datos, asistido por una computadora PC50. Este programa cinético está concebido desde el programa madre (18) que encierra prácticamente todas las técnicas de optimización (15) para el ajuste de cualquier conjunto de datos experimentales a modo de menú para usuarios de Windows, llamado OPKINE.

Las curvas directas son obtenidas a través de técnicas de programación no lineal para el ajuste por el método de los mínimos cuadrados simple utilizando un algoritmo de búsqueda directa como es el de Rosenbrock, y uno de gradiente como es el de DFP para la minimización de la función cuadrática objetivo. Se ha aplicado, además, simulaciones de Monte-Carlo con números aleatorios en el perfil de distribución de probabilidad acumulada, para sintetizar conjuntos ajustados en la consecución del error de cada parámetro (modelización del error).

#### EL MODELO DE STENBERG

En este estudio la cinética es analizada con especial atención sobre las propiedades específicas de la interfase sólido - líquido. El doctor Manne Stenberg junto con sus colaboradores han desarrollado estos métodos cinéticos de tal manera que han creado escuela en el análisis de interacción molecular sumamente extendida en las investigaciones llevadas a cabo en la Universidad de Uppsala (Suecia) (12) (13) (23) (24) (25)

#### Ecuaciones de velocidad

El anticuerpo adopta forma de Y con dos brazos en cuyas extremidades se encuentran las regiones hipervariables (Figura 1). Por tanto, cada molécula de IgG (molécula ligante) podrá unir dos moléculas de Ag (ligando en solución). Veamos las ecuaciones de velocidad que caracterizan el mecanismo de reacción:

$$\frac{d\Gamma_1}{dt} = 2k_1c_s(\Gamma_0 - \Gamma_1 - 2\Gamma_2) - \Gamma_1(k_{-1} + k_2) + 2k_{-2}\Gamma_2 \quad (1)$$

$$\frac{d\Gamma_2}{dt} = k_2\Gamma_1 - 2k_{-2}\Gamma_2 \quad (2)$$

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D\nabla^2 c \quad (3)$$

En donde:  $\Gamma_0$  es la concentración superficial de Ac libre o capacidad de la monocapa,  $\Gamma_1$  la concentración superficial de anticuerpo simplemente ocupado y  $\Gamma_2$  la concentración superficial de anticuerpo doblemente ocupado. Hay que tener en cuenta que el receptor inmovilizado o molécula ligante posee dos sitios de unión específicos del anticuerpo, con lo que:  $\Gamma_0 - \Gamma_1 - 2\Gamma_2$  será el número de sitios libres.

$C_0$  es la concentración inicial de ligando antigénico en estadios iniciales y en condiciones distantes a la interfase reactiva.  $C$  es la concentración de ligando antigénico libre en cualquier instante de tiempo y  $C_s$  es la concentración de antígeno próximo a la interfase sólido-líquido.

ESQUEMA DE REACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO.

$$c(r,t) = c_0 - \frac{hR^2 c_0}{r(Rh+1)} \left\{ \operatorname{erfc} \frac{r-R}{2\sqrt{Dt}} - \exp[h'(r-R) + h^2 Dt] \operatorname{erfc} \left[ \frac{r-R}{2\sqrt{Dt}} + h'\sqrt{Dt} \right] \right\}$$

$$c(R,t) = \frac{c_0}{1+D_a} \left\{ 1 + D_a \exp \left[ \frac{(1+D_a)^2}{R^2} Dt \right] \operatorname{erfc} \left[ \frac{(1+D_a)}{R} \sqrt{Dt} \right] \right\} \quad h = \frac{k_f \Gamma_0}{D} \quad h' = \frac{h+1}{R} \quad Rh = D_a$$

Carlslaw & Jaeger: 1959

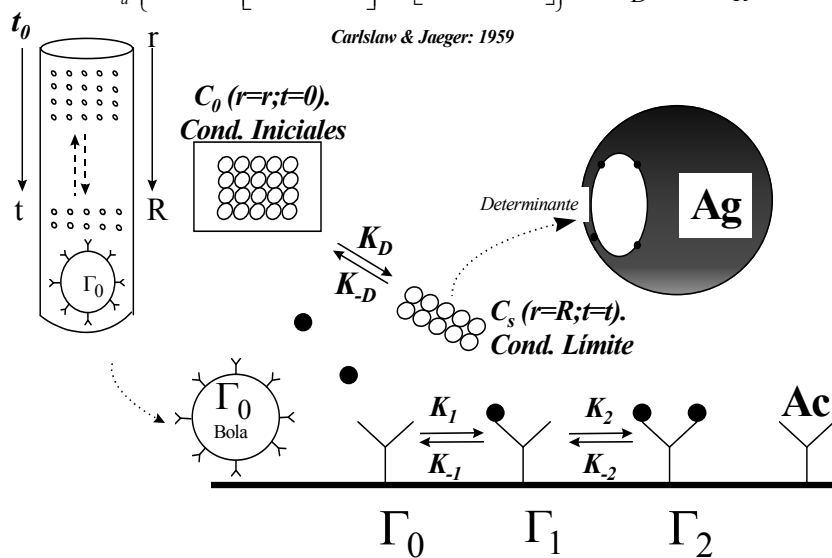


Figura 1

La ecuación (1) caracteriza la formación de complejo monovalente, es decir, para un sitio de unión del ligando, mientras que la ecuación (2) lo hace para la formación de complejo bivalente con dos sitios;  $k_1$   $k_2$   $k_{-1}$   $k_{-2}$  son, en este orden, las microconstantes de velocidad de reacción directa monovalente, directa bivalente, inversa monovalente e inversa bivalente. Las constantes híbridas dependientes de las microconstantes puras son:  $k_f$  y  $k_r$ , constantes globales de velocidad de reacción directa e inversa respectivamente. La ecuación (3) no es más que el tratamiento de la difusión por transporte de masa

En los estadios iniciales de la reacción puede aceptarse que:

1.  $\Gamma_1$  y  $\Gamma_2 \ll \Gamma_0$ . La capacidad de la monocapa es muy superior a las fracciones de superficie cubierta debida a los complejos mono y bivalente, con lo que la reacción no ha alcanzado todavía el estado de

equilibrio asegurando un grado de avance en la reacción significativo durante el curso del experimento.

2. Para anticuerpos bivalentes (como son los IgG utilizados) y a altas concentraciones receptor, podemos asumir que:  $2k_{-2}/k_2 \ll 1$ , por tanto  $k_2$  es mucho mayor que el doble de  $k_{-2}$ .
2. Con  $k_{-1} \approx k_{-2}$  del mismo orden de magnitud, conseguimos una constante de velocidad de reacción inversa:  $k_r = 2k_1k_{-2}/k_2$  pequeña, con lo que el par de equilibrios consecutivos se encuentran desplazados hacia la formación de los productos inmunológicos.

Con estas premisas resulta para la constante de velocidad de reacción directa  $k_f = 2k_1$ . Puede ahora formularse una expresión simplificada para la reacción inicial de enlace omitiendo la disociación:

Si los sitios de unión están localizados en la superficie de una bola o esfera macroscópica de radio R, consideramos un problema de difusión con geometría esférica en concentración dependiente de las coordenadas r y del tiempo t. La ley de difusión de Fick describe la velocidad de transferencia de sustancia en la superficie.

$$\frac{d\Gamma_A}{dt} = D \frac{\partial c}{\partial r} \Big|_{r=R}$$

Con estos condicionamientos se obtiene la ecuación integrada:

$$\Gamma_a = c_0 \sqrt{D\tau} \frac{D_a^3}{(1+D_a)^3} \left[ \frac{\bar{t}^*}{D_a} + 2\sqrt{\frac{\bar{t}^*}{\pi}} + \exp(\bar{t}^*) \operatorname{erfc}(\sqrt{\bar{t}^*}) - 1 \right] \quad (4)$$

Multiplicándola por una constante de proporcionalidad  $\alpha$

para convertir la concentración superficial de inmunocomplejos y sumándole una Rb (radiactividad basal), debida a uniones inespecíficas:

$$A = A^\# + Rb = \alpha\Gamma_A + Rb$$

Obtenemos una función adaptada a nuestro propósito que relaciona la radiactividad en cpm debida al inmunocomplejo (A) con el tiempo (t).

Los pares de valores (A,t) están ajustados a la ecuación [79], que llamaremos ecuación completa de Stenberg.

$$A = \alpha \cdot \beta_0 \cdot \left[ \beta_2 t + \frac{2}{\sqrt{\pi}} \beta_1 \sqrt{t} + \exp(\beta_1^2 t) \cdot \operatorname{erfc}(\beta_1 \sqrt{t}) - 1 \right] + Rb \quad (5)$$

Donde  $\beta_0, \beta_1, \beta_2$  se definen como:

$$\beta_0 = \frac{D_a R C_0}{(D_a + 1)^3} \quad \beta_1 = \frac{D_a + 1}{D_a} \cdot \frac{1}{\sqrt{\tau}} \quad \beta_2 = \frac{\beta_1^2}{D_a}$$

### Parámetros de la ecuación completa de Stenberg

La eq. (5) contiene explícita o implícitamente cuatro parámetros que deben ser optimizados por el método de m.m.c.c simple para obtener perfiles teóricos con máxima verosimilitud. Veamos cuáles son:

#### *Número de Damkoehler:*

Es la razón entre velocidades máximas de reacción y difusión, con lo que si el cociente es  $>1$  o  $<1$ , será suficiente para describir el grado de control por difusión que existe en la reacción global.

$$D_A = \frac{\left(\frac{d\Gamma_A}{dt}\right)_{\text{Reaccion}_{max}}}{\left(\frac{d\Gamma_A}{dt}\right)_{\text{Difusion}_{max}}} = \frac{k_f \cdot c_s \cdot \Gamma_0}{\frac{DC_0}{R}} \longrightarrow \boxed{D_A = \frac{k_f \cdot \Gamma_0 \cdot R}{D}}$$

Por tanto, es un parámetro adimensional inversamente proporcional al coeficiente de difusión, con lo que bajas difusividades provocarán números altos. A su vez, es directamente proporcional a la capacidad de la monocapa retenida y a la constante de asociación.

#### *Constante de tiempo (TAU):*

Tiene unidades de tiempo y es inversamente proporcional al cuadrado de la constante de asociación y de la capacidad de la monocapa.

Es directamente proporcional al coeficiente de difusión de las especies homólogas en el líquido.

$$D_a = \frac{RK_f\Gamma_0}{D} \left\{ \begin{array}{l} K_f\Gamma_0 \\ D \end{array} = \frac{1}{\sqrt{D\tau}} \rightarrow \sqrt{D\tau} = \frac{D}{K_f\Gamma_0} \rightarrow \tau = \frac{D}{(K_f\Gamma_0)^2} \right.$$

$$D_a = \frac{RK_f\Gamma_0}{R} \left\{ \begin{array}{l} K_f\Gamma_0 \\ D \end{array} = \frac{1}{\sqrt{D\tau}} \rightarrow \sqrt{D\tau} = \frac{D}{K_f\Gamma_0} \rightarrow \tau = \frac{D}{(K_f\Gamma_0)^2} \right.$$

### ***Radiactividad basal***

Es la actividad residual debida a uniones inespecíficas del trazador. Se exterioriza como la ordenada en el origen a tiempo cero en las representaciones directas A,t.

### ***Concentración inicial aparente:***

Este cuarto parámetro ha sido denominado de esta manera porque sus valores optimizados deben seguir una proporcionalidad lineal con las concentraciones relativas de Ag en solución y a cuya pendiente, al igual que ocurre con la ley de Lambert-Beer, denominaremos coeficiente señal-concentración.

$$C'_0 = \alpha C_0 \sqrt{D\tau}$$

↓  
Coeficiente  $\frac{s}{c} = \alpha \sqrt{D\tau}$

### **Simplificación de la ecuación de Stenberg**

En condiciones de control por difusión el número de Damkoehler tiende a infinito, con lo que desaparece el término lineal de la ecuación (4). Del mismo modo, la razón entre números tenderá a 1, con lo que la

función gamma quedará simplificada a una nueva expresión eq. (6). Sustituyéndola en tiempo real, la eq. (7) permite eliminar la raíz cuadrada de  $\tau$ , quedando finalmente la eq. (8) correspondiente a la ecuación de una recta.

$$\Gamma_A = C_0 \sqrt{D\tau} \left[ 2\sqrt{\frac{\bar{t}^*}{\pi}} + \exp(\bar{t}^*) \cdot \operatorname{erfc}(\sqrt{\bar{t}^*}) - 1 \right] \quad (6)$$

$$\Gamma_A = C_0 \sqrt{D\tau} \left[ 2\sqrt{\frac{t}{\tau\pi}} + \theta - 1 \right] \quad (7)$$

$$\Gamma_A = 2C_0 \sqrt{\frac{D}{\pi}} \sqrt{t} + w \quad (8)$$

La ordenada en el origen en la recta vendrá condicionada por  $\theta$ . Si expresamos la eq. en función de las actividades (CPM), obtenemos la ecuación simplificada de Stenberg (eq. (9)).

$$A = 2\alpha C_0 \sqrt{\frac{D}{\pi}} \sqrt{t} + (\alpha w + Rb) \quad (9)$$

Ecuación que predice una proporcionalidad lineal entre la actividad y la raíz cuadrada del tiempo en caso de cumplirse un número de Damkoehler tendente a  $\infty$  (condición de control por difusión).

#### EL MODELO DE KARLSSON

Este modelo (8) fue estudiado para la unión de la Noscapina tritiada (antitusígeno) frente a tejido cerebral homogeneizado de cobaya, cuyos procesos de unión pudieron ser discriminados por sus cinéticas. El método puede encontrar aplicación general para poblaciones de receptor de uno y dos sitios de unión en exceso de ligando.

El análisis de los datos de enlace en equilibrio es muy utilizado a la hora de determinar la actividad de una droga capaz de unirse a una o

varias poblaciones de receptor. Sin embargo, como apuntó Weber (26), la detección de dos sitios de unión con estudios de enlace en equilibrio requiere que el ligando tenga una afinidad diferente para los dos sitios de unión. La magnitud de la razón entre afinidades necesaria para discernir entre ellos depende de la variación experimental y las densidades relativas de los dos sitios receptores

Al caracterizar la cinética de unión ligando-receptor fueron detectadas heterogeneidades, lo que podría indicar la existencia de dos sitios de unión que no aparecieron en los estudios de enlace en equilibrio. Al detectarse a través de los datos iniciales que el enlace podría no estar adscrito a ningún tipo de receptor conocido, se desarrolló una estrategia para la diferenciación de modelos de enlace basado sólo en sus propiedades cinéticas. Para este propósito Motulsky y Mahan (10) desarrollaron un método cinético utilizando ligandos selectivos. Cada uno de estos métodos necesitan algún conocimiento de los sitios de unión, tejidos y ligandos.

Basándonos solamente en los datos cinéticos este método nos permitirá discriminar entre modelos de unión y estimar los parámetros de enlace. A partir de ensayos de asociación y disociación los datos experimentales pueden ser ajustados simultáneamente a modelos con cinéticas mono o bifásicas con la ayuda de un programa informático específicamente creado en el departamento para la ocasión, y con los mismos métodos de optimización que los aplicados en el proceso de minimización de la función cuadrática objetivo en la función de Stenberg.

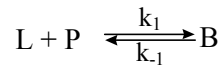
La cantidad de ligando asociado a los sitios de unión saturables en el tiempo  $t$  ( $B_{ass,t}$ ) depende de las constantes de velocidad de asociación ( $k_1$ ) y disociación ( $k_{-1}$ ), así como de la cantidad de ligando libre ( $L$ ) y la concentración total de sitios de unión ( $B_{max}$ ), de acuerdo a la eq. (10):

$$B_{ass,t} = \frac{B_{max}}{1 + \frac{k_{-1}}{k_1 \cdot (L)}} \cdot \left[ 1 - e^{-(k_1 \cdot (L) + k_{-1}) \cdot t} \right] \quad (10)$$

### **Deducción de la ecuación de Karlsson**



Supóngase un ligando o antígeno (L) que reacciona con una proteína o anticuerpo (P), según el siguiente esquema de reacción:



La concentración total de molécula ligante en el estado inicial es la suma:

$$(P)_0 = (P) + (B)$$

La velocidad de formación de los componentes productos puede ser expresada por la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{d(B)}{dt} = k_1(P)(L) - k_{-1}(B) = k_1[(P)_0 - (B)](L) - k_{-1}(B)$$

Desarrollando los términos de la ecuación de velocidad, resulta:

$$\frac{d(B)}{dt} = k_1(P)_0(L) - k_1(B)(L) - k_{-1}(B) = -[(k_1(L) + k_{-1})B - k_1(P)_0(L)]$$

$$\frac{d(B)}{(k_1(L) + k_{-1})(B) - k_1(P)_0(L)} = -dt$$

Para obtener la ecuación integrada debe integrarse entre límites definidos:

$$\int_0^{(B)} \frac{(k_1(L) + k_{-1})d(B)}{(k_1(L) + k_{-1})(B) - k_1(P)_0(L)} = -(k_1(L) + k_{-1}) \int_0^t dt$$

$$\ln \frac{(k_1(L) + k_{-1})(B) - k_1(P)_0(L)}{-k_1(P)_0(L)} = -(k_1(L) + k_{-1})t$$

$$(k_1(L) + k_{-1})(B) - k_1(P)_0(L) = -k_1(P)_0(L) \cdot e^{-(k_1(L) + k_{-1})t}$$

Despejando la concentración de molécula ligada al anticuerpo resulta:

$$B = \frac{(P)_0}{1 + \frac{k_{-1}}{k_1(L)}} \left[ 1 - e^{-(k_1(L) + k_{-1})t} \right] \quad (11)$$

Donde B representa la cantidad de reactivo unido o asociado a tiempo t y (P)<sub>0</sub> como la máxima cantidad ligada que se puede unir al reactivo, es decir, la máxima capacidad de unión.

$$B \equiv B_{ass,t} \quad (P)_0 \equiv B_{max} \quad (12)$$

La eq. (11) es idéntica a la eq. (10) sin más que realizar los cambios enunciados en (12), quedando :

$$B_{ass,t} = \frac{B_{max}}{1 + \frac{k_{-1}}{k_1 \cdot (L)}} \cdot \left[ 1 - e^{-(k_1 \cdot (L) + k_{-1}) \cdot t} \right] \quad (10)$$

La cual, una vez adaptada a nuestro propósito, se transforma en:

$$Y_{ki} = \alpha 0i + \frac{\alpha}{1 + \frac{\beta}{C}} \cdot \left[ 1 - e^{-(\gamma + \delta C)t} \right] \quad (13)$$

La cantidad de ligando asociado a los sitios de unión saturables en el tiempo t (B<sub>ass,t</sub>) depende de las constantes de velocidad de asociación (k<sub>1</sub>)

y disociación ( $k_{-1}$ ), así como de la cantidad de ligando libre (L) y la concentración total de sitios de unión ( $B_{\max}$ ), de acuerdo a la eq. (10).

En el tratamiento matemático realizado se ha supuesto despreciable la constante de reacción inversa [ $\gamma$ ], lo cual equivale a considerar la reacción global como prácticamente irreversible calculándose la constante de velocidad de asociación [ $\delta$ ]. Hay que tener en cuenta que  $\delta$  no es igual a la constante de velocidad  $k_1$ , sino que es directamente proporcional a ella, ya que la concentración expresada en unidades relativas (c) se relaciona con la concentración en  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  [L] por la expresión:  $c = \theta[L]$ , con lo que resulta:  $k_1[L] = \delta c = \delta\theta[L]$ , de donde  $k_1 = \theta\delta$ .

A su vez, la irreversibilidad supuesta autoriza a despreciar igualmente el cociente  $\beta/C$ , ya que el parámetro  $\beta$  es directamente proporcional a  $k_{-1}/k_1$ , siendo este último término igual a la constante de equilibrio de la reacción inversa, que por la mencionada hipótesis puede considerarse muy pequeña. En cálculos de optimización no incluidos aquí hemos intentado obtener valores de  $\beta$  que nos proporcionaran información sobre la reacción inversa, pero los valores obtenidos fueron muy poco consistentes en cuanto a su relación con la temperatura, por lo que consideramos preferible realizar la aproximación de  $\beta$  tendente a cero.

### Parámetros del modelo de Karlsson

Con estas aproximaciones la ecuación (13) expresa la actividad ligada ( $y_{ki}$ ) como función de dos variables ( $C, t$ ) obteniéndose cuatro parámetros:

**Actividad a tiempo cero ( $\alpha_0$ ).**- Teóricamente sería nula ya que la concentración inicial de inmunocomplejo es cero pero en la práctica se obtiene un valor pequeño debido a las uniones inespecíficas.

**Concentración total de lugares de unión ( $\alpha$ ).**-Representa la capacidad máxima de enlace del anticuerpo expresada en cpm.

**Constante de equilibrio para la asociación ( $\beta$ ).**- Es el cociente entre las constantes de velocidad de las reacciones directa e inversa.

**Constante aparente de velocidad ( $\delta$ ).**- Comentada anteriormente

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha estudiado la cinética de las reacciones con sus anticuerpos específicos para la FSH, LH, T3 Insulina (INS), DHEA, Osteocalcina (OSTC), PTH, Enolasa Específica Neuronal (NSE), Tiroglobulina con dos anticuerpos (TG1 y TG2), Antígeno Asociado a Cáncer con dos anticuerpos (CA1 y CA2), Estradiol (Estr), Cortisol (Cortis), Progesterona (Prog) y Testosterona (Test), mediante la aplicación de los modelos teóricos de Karlsson y Stenberg en función de la concentración de reactivos y temperatura

### **Criterios de control por difusión basados en el modelo de Stenberg**

Para considerar que un proceso está controlado por la difusión, no basta con encontrar un ajuste satisfactorio a la ecuación integrada de Stenberg, pues en su deducción se consideran tanto efectos difusivos como reactivos. El parámetro más decisivo y que en principio puede adoptarse como criterio de validación, es el número de Damkoehler. No obstante, cabe la posibilidad de que un ajuste satisfactorio a la ecuación de Stenberg, lo sea solo aparentemente. Al fin al cabo dicha ecuación corresponde a una simple función creciente con perfil de tipo parabólico. Por tanto, se necesitan nuevos criterios que confirmen la calidad del ajuste. En este sentido es útil comprobar la proporcionalidad existente entre la concentración inicial aparente y la concentración inicial. Tal comprobación confirma el buen seguimiento de la ecuación de Stenberg.

Un segundo aspecto a tener en cuenta es que, para números de Damkoehler suficientemente altos, la ecuación de Stenberg se reduce a una forma simplificada, que predice una relación lineal entre  $Z$  y la raíz cuadrada del tiempo. Un buen ajuste a dicha ecuación simplificada confirma que nos encontramos en condiciones correspondientes a número

de Damkoehler grande. La pendiente de las gráficas obtenidas en este último caso debe ser proporcional a la concentración inicial.

En caso de comprobarse esta última relación, quedaría definitivamente confirmado el buen seguimiento de la ecuación de Stenberg.

Por tanto, y como resumen de lo anterior, estableceremos los siguientes criterios de posible control por difusión

1. *Ajuste satisfactorio a la ecuación de Stenberg, con valores aceptables de  $\tau$*
2. *Números de Damkoehler altos*
3. *Proporcionalidad entre concentración inicial aparente y concentración inicial*
4. *Buen seguimiento de la ecuación de Stenberg simplificada.*
5. *Proporcionalidad entre la pendiente de la gráfica correspondiente a esta última ecuación y la concentración inicial.*
6. *Finalmente, en caso de cumplirse los criterios anteriores es necesario comprobar que la entalpía de activación calculada a partir de la ecuación de Eyring es del orden de magnitud de la energía de flujo viscoso del agua. ( $\square H^{\ddagger} < 9000 \text{ cal mol}^{-1}$ ).*

Debe hacerse notar que las condiciones correspondientes a los criterios 3 y 5 no son independientes entre sí, por lo que hay que hacer especial hincapié en la exigencia de que ambos criterios se cumplan o fallen simultáneamente.

Téngase en cuenta que la concentración inicial aparente procede de ajustes no lineales, de A frente a t, la pendiente de la ecuación simplificada, tiene origen en ajustes lineales de A frente a  $\sqrt{t}$ . Por tanto, la concordancia entre ambos, caso de producirse, no puede considerarse casual y refuerza considerablemente la hipótesis.

### **Criterios de control por difusión basados en el modelo de Karlsson**

El modelo no presenta condicionamientos específicos en cuanto a efectos difusivos, pero permite la determinación de la constante de velocidad a distintas temperaturas, posibilitando el cálculo de la energía y entalpía de activación, que, como se indicó al comentar el modelo de Stenberg, debe ser inferior a  $9000 \text{ cal mol}^{-1}$

### **Comparación de ambos modelos**

La característica fundamental del modelo de Stenberg es la flexibilidad, ya que considera en principio tanto el fenómeno de la difusión, como el de la reacción propiamente dicha, llegando a una ecuación de velocidad integrada que relaciona la concentración de receptores del anticuerpo ocupados con el tiempo de reacción, a través de cuatro parámetros. El hecho de considerar específicamente la influencia de la difusión y de suministrar un parámetro como el número de Damkohler le hace particularmente informativo y adecuado para su aplicación a nuestro propósito. Su principal inconveniente es que su aplicación se restringe a los estadios iniciales de la reacción, y por tanto no reproduce correctamente los valores en la zona de equilibrio

El modelo de Karlsson resulta genérico y relativamente inespecífico, ya que consiste básicamente en la obtención de una ecuación de velocidad para unas reacciones reversibles, siendo la reacción directa de segundo orden y la inversa de primero. Además en su desarrollo matemático es necesario admitir que el término  $k_1[L] + k_{-1} = (\delta[L] + \gamma)$  se mantiene razonablemente constante durante el periodo de reacción, lo cual implica exceso de ligando, condición que habitualmente, (aunque no siempre) se cumple en los sistemas radioinmunoanalíticos. Es en general más flexible (o quizá menos exigente) que el de Stenberg, ajustándose razonablemente bien durante todo el curso de la reacción, incluido el equilibrio.

Como resumen, puede decirse que ambos modelos se complementan.

### **Influencia de la temperatura en la reacción**

Se ha estudiado mediante el ajuste de las constantes de velocidad obtenidas frente a la temperatura a través de las ecuaciones :

$$k = A_f \exp (-E_a / RT) \quad (\text{Arrhenius}) \quad y$$

$$k = B T \exp (-\Delta H^\ddagger / RT) \quad (\text{Eyring}).$$

Los valores de  $\Delta H^\ddagger$  calculados por ambos modelos se muestran en el Cuadro 1

En las reacciones controladas por difusión la constante de velocidad es inversamente proporcional a la viscosidad del disolvente:

$$k = 8RT/3\eta$$

La viscosidad se relaciona con la temperatura a través de la ecuación de Guzmán :

$$\eta = A \exp (E/RT)$$

Con lo que la dependencia de la constante de velocidad con la temperatura adopta una forma equivalente a la ecuación de Eyring:

$$k = (8R/3A) T \exp (- E/RT)$$

De modo que, comparando términos, resulta que la entalpía de activación coincide con la energía E de flujo viscoso, que en el caso del agua es aproximadamente igual a la mitad de la entalpía de vaporización, por lo que para reacciones en disolución acuosa controladas por difusión, el valor aparente de  $\Delta H^\ddagger$  debe ser de este mismo orden, por lo que tomaremos un valor de  $9000 \text{ cal mol}^{-1}$  como límite máximo

El análisis de los resultados de acuerdo con los criterios expuestos anteriormente se resume en los cuadros 1 y 2

### **CUADRO 1**

	Stenberg			Karlsson		
	Ajuste	$\Delta H^{\bar{}}$	Cont Dif	Ajuste	$\Delta H^{\bar{}}$	Cont Dif
FSH	Malo	36646	NO	Regular	8335	SI
LH	Bueno	8144	SI	Bueno	5889	SI
T3	Malo	-----	NO	Bueno	-----	¿
INS	Bueno	7670	SI	Bueno	7336	SI
DHEA	Bueno	15073	NO	Bueno	6428	SI
OSTC	Bueno	1239	SI	Bueno	3646	SI
PTH*	Malo	97744	NO	Regular	54694	NO
NSE	Malo	18212	NO	Bueno	7715	SI
TG 1	Bueno	-----	¿	Bueno	-----	¿
TG 2	Malo	-----	NO	Malo	-----	NO
CA 1	Malo	9764	NO	Bueno	-606	SI
CA 2	Bueno	4958	SI	Bueno	389	SO
Estr	Aceptable	8770	SI	Aceptable	4504	SI
Cortis	Bueno	-----	¿	Malo	-----	¿
Prog	Bueno	16642	NO	Bueno	8811	SI
Test	Malo	-----	NO	Bueno	-----	¿

\* Posible alteración

## CUADRO 2

Control Difusión	Stenberg	Karlsson
SI	5 (31,3%)	10 (62,5%)
NO	9 (56,3%)	2 (12,5%)
Dudoso	2 (12,5%)	4 (25,0%)

## CONCLUSIÓN GENERAL

*A la vista de los cuadros anteriores puede deducirse que los resultados, en un elevado tanto por ciento, confirman la hipótesis en cuanto al control difusivo de la reacción antígeno – anticuerpo.*



## BIBLIOGRAFÍA

- (1) ANTON FOS, G., MORENO FRIGOLS, J.L., SALABERT SALVADOR, M.T., MUT RONDA, S.Y PEREZ GIMENEZ, F. (1991) "Influencia de la temperatura de incubación y cálculo de parámetros cinéticos de la reacción entre el 125Estradiol y su anticuerpo específico en fase sólida". *Anal. Real Acad. Farm.*, 57:317-326
- (2) ANTON FOS, G. , MORENO FRIGOLS, J.L.. SALABERT SALVADOR, M.T., MUT RONDA ,S. Y PEREZ GIMENEZ, F. (1991) "Estudio de la cinética de reacción entre 125I-Cortisol y su anticuerpo específico en fase sólida." *Anal. Real Acad. Farm.* 57:43-50
- (3) ANTON FOS, G., MORENO FRIGOLS J.L., SALABERT SALVADOR, M.T., MUT RONDA, S Y PEREZ GIMENEZ, F. (1990) "Estudio de la Influencia en la Velocidad de Reacción de la Viscosidad del disolvente en la reacción entre el 125I-Testosterona y su anticuerpo específico en fase sólida". *Industria Farmacéutica - Investigación y Tecnología.*
- (4) ASISH XAVIER, K. AND WILLSON, R. C. (1998) "Association and Dissociation Kinetics of Anti-Hen Egg Lysozyme Monoclonal Antibodies HyHEL-5 and HyHEL-10" *Biophysical Journal* 74, 2036 – 2045.
- (5) DE LISI,C., WIEGEL,F (1981). "Effect of nonspecific forces and finite receptor number on rate constants of ligand-cell bound-receptorinteractions". *P.N.E. As USA* 78 : 5569-5572
- (6) GALLEGO GARCÍA, C., MORENO FRIGOLS, J.L, CIUDAD PLATERO, J. (1991)"Estudio cinético de la reacción antígeno-anticuerpo que tiene lugar en la valoración de la hormona foliculo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) mediante radioinmunoanálisis (RIA)" *Anal. Real Acad. Farm.*, 57:581-594
- (7) GALLEGO GARCÍA, C., MORENO FRIGOLS, J.L.Y CIUDAD PLATERO, J. (1992) "Efecto de la temperatura sobre la velocidad de la reacción en la determinación cuantitativa de la hormona foliculo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) mediante radioinmunoanálisis (RIA)". *An. Real Acad. Farm.*, 58:59-65
- (8) KARLSSON, M. NEIL A. "Estimation of binding parameters by kinetic data analysis: Differentiation between one and two binding sites". *Eur. J. of Pharm.* 148 , 115-125 (1988)
- (9) Miles L.E.M.and Hales C.N. (1970) "Immunoradiometric assay procedures: Newdevelopments". En *In vitro procedures with radioisotopes in medicine.* 483-484. Viena .
- (10) MOTULSKY, H.J.AND L. C.MAHAN (1984) "The kinetics of competitive radioligand binding predicted by the law of mass action". *Mol.Pharmacol.* 25, 1.

- (11) NORTHROP, S.H. AND ERICKSON, H.P. (1992) "Kinetics of protein-protein association explained by Brownian Dynamics computer simulation" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(8) : 3338-42
- (12) NYGREN H, WERTHEN M AND STENBERG.M (1988) "Kinetics of antibody binding to solid-phase- immobilised antigen. Effect of diffusion rate limitation and steric interaction". *Journal of Immunological Methods*. 101 : 63-71
- (13) NYGREN H AND STENBERG M (1989) "Immunochemistry at interfaces". *Immunology*, 66: 321-327
- (14) OLIVAS ARROYO, C., MORENO FRIGOLS, J.L. (1998) "Aspectos cinéticos y difusivos de la competición trazador-analito en radioinmunoanálisis de Péptido C" *Anal.Real Acad. Farm*, 64 : 615-633
- (15) "Optimization, Theory and Applications" 2ª Edición.SS Rao. Wiley Eastern Limited.
- (16) VAN OSS, C.J. (1997) "Kinetics and Energetics of Specific Intermolecular Interactions" , *J. Mol. Recogn* , 10 , 203-216
- (17) PEREA FALOMIR, MANUEL. (1998) "Aplicación de los modelos matemáticos de Karlsson y Stenberg a la caracterización cinética de algunas reacciones antígeno-anticuerpo". Tesis Doctoral. Universidad de Valencia
- (18) PÉREZ PLA, FRANCISCO. "Métodos de optimización OPKINE". Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- (19) RAMAN, C.S. ET AL. (1992) "Diffusion-limited rates for monoclonal antibody binding to cytochrome C. *Biochemistry* 31(42) : 10370-9
- (20) RABBANY ET AL. (1998) "Dissociation rate kinetics in a solid-phase flow immunoassay", *Analytical letters*, 31(10), 1663-1675
- (21) SAN MARTIN CIGES, E., MORENO FRIGOLS, J.L.,Y .PERIS RIBERA, J.E. (1998) "Cinética de las reacciones producidas en el análisis inmunoradiométrico (IRMA) de algunos marcadores tumorales". *Anal.Real Acad. Farm* 64 :513-531
- (22) SAN MARTIN CIGES, E., MORENO FRIGOLS, J.L. PERIS RIBERA J.E.Y SAN MARTÍN M.D. (1998) "Cinética de las reacciones producidas en el radioinmunoanálisis (RIA) de algunas sustancias". *Ars Pharmaceutica*, 39 (1) : 19-28
- (23) STENBERG M AND STIBLERT L. (1986) "External diffusion in Solid-Phase Immunoassays". *J. Theor. Biol* 120 : 129-140
- (24) STENBERG M AND NYGREN H. (1988) "Kinetics of antigen-antibody reactions at solid-liquid interfaces". *J. Immunol. Methods* 113 :3-15
- (25) STENBERG M, WERTHEN M, THEANDER S AND NYGREN.H (1988) "A diffusion limited reaction theory for a microtiter plate assay" *Journal of Immunological Methods*. 112 : 23-29.
- (26) VOSS, E.W. (1993) "Kinetic measurements of molecular interactions by spectrofluorometry" *J. Mol. Recogn* , 6(2) : 51-8
- (27) WEBER,G. "The binding of small molecules to proteins", in: *Molecular Biophysics*, eds. B. Pullman and M.Weissblut (Academic Press, New York) p. 369

- (28) YALOW R.S., BERSON. S.A. (1970) "General aspects of radioimmunoassay procedures." En: *In vitro procedures with radioisotopes in medicine*. 455-457. Viena
- (29) ZUBER, E., MATHIS, G. AND FLANDROIS, J.-P. (1997) "Homogeneous Two-Site Immunometric Assay Kinetics as a Theoretical Tool for Data Analysis" *Analytical Biochemistry* 251 : 79-88
- (30) ZUBER ET AL. (1997) "A descriptive model for the kinetics of a homogeneous fluorometric immunoassay" *Journal of Immunoassay* , 18(1) , 21-47