

29 MAR. 1963 2 833 02

P.- 23.772

OA/3920-521



MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud de

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

formulada el 12 de diciembre de 1962, con el nº 283.302

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de N.V. ORGANON, entidad holandesa, establecida en Kloosterstraat 6, Oss, Holanda, por:

"PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UN REACTIVO PARA
LA DETERMINACION DE GONADOTROPINAS"

=====

Este invento se refiere a reactivos para la determinación de gonadotropinas y a métodos para la preparación y uso de dichos reactivos.

5 En la revista Schweiz. Z. Path. Bakt. 22,1(1959), ha descrito R. Weinbach que los eritrocitos tratados con formalina y ácido tánico son vehículos adecuados para antígenos. Estos eritrocitos cargados con antígeno reaccionan con un antisuero adecuado presente formando un precipitado difuso de color amarillo claro (aglutinado).

10 Basados en este principio, I. Wide y C.A. Gemzell han

283302

29



desarrollado una reacción del embarazo (véase Acta Endocrinol. 35, 261 (1960). En efecto, si la gonadotropina coriónica humana se usa como antígeno, la reacción arriba mencionada puede prevenirse añadiendo una cantidad extra de antígeno a la mezcla de reacción. Usando orina de embarazo humano, puede reconocerse fácilmente el embarazo. Cuando hay suficiente gonadotropina coriónica en la orina, los eritrocitos libres se sedimentarán en el fondo de la vasija de reacción en forma de un anillo pardo oscuro. Por tanto, un anillo indica embarazo y un precipitado difuso lo contrario. Puede consultarse la solicitud de patente española de la solicitante nº 276.772 que da una descripción general del reactivo fundamental y su preparación y uso.

Este método puede aplicarse también al diagnóstico de fenómenos patológicos, en cuyo caso hay también gonadotropinas en la orina, y para la determinación de otras gonadotropinas, tal como suero-gonadotropina en el suero de yeguas preñadas y gonadotropinas de hipófisis en extractos pituitarios. Estas dos últimas determinaciones son importantes para la selección de la materia prima para la preparación de estas hormonas.

Sin embargo, la solicitante ha encontrado que, en algunos casos este método de determinación conduce a conclusiones falsas y que, en otros, el resultado es dudoso, especialmente cuando se examina orina que no es reciente.

Se ha encontrado ahora que puede mejorarse considerablemente la exactitud de la determinación de las gonadotropinas realizándola en presencia de uno o más compuestos capaces de fijar iones calcio en una forma de complejo soluble. Dicho con otras palabras: agentes quelantes. En efec-



to, la solicitante ha encontrado, mediante ensayos comparativos, que se acaba una conclusión falsa cuando el contenido de iones calcio del liquido que se quiera examinar es mayor del normal. El contenido de estos iones en orina reciente es bastante bajo, del orden de, aproximadamente, 0,1 mg/ml. de una cantidad total de calcio de, aproximadamente 0,24 mg/ml. Sin embargo, estas cifras difieren mucho según los casos.

Probablemente, el calcio de la orina reciente está combinado en gran parte con proteínas, de manera que la pequeña cantidad de iones calcio libres restantes no pueden perturbar el ensayo. Sin embargo, cuando se deja la orina en reposo durante unos pocos días, el contenido de iones calcio puede aumentar hasta un valor de, aproximadamente, 0,2 mg/ml. cuyo incremento ha sido ocasionado probablemente por escisión de los mencionados complejos de calcio-proteína. El exceso de iones calcio causa una aglutinación espontánea de los eritrocitos, independientemente de la presencia de gonadotropina coriónica. El aglutinato tiene el aspecto del aglutinato formado cuando se ha empleado orina negativa. Dicho con otras palabras, una orina positiva (que contenga gonadotropina coriónica) se comporta del mismo modo que una orina negativa (sin gonadotropina coriónica), como consecuencia de su elevado contenido de iones calcio. Preferiblemente, debe usarse una cantidad tal de agente quelante que quede fijado el exceso de iones calcio. Un exceso de agente quelante no influye en la determinación. Por la fijación completa del calcio presente, el resultado es correcto en todas las condiciones.

Lo mismo que sucede en la forma de determinación co-

283302

29



nocida, este método mejorado puede usarse también para la determinación cualitativa y cuantitativa de gonadotropinas, p. ej. en orina de embarazo humano, en el suero de yeguas preñadas y en extractos pituitarios.

5 Un objeto del invento es un reactivo para la determinación de gonadotropina que comprende (a) eritrocitos sensibilizados con una gonadotropina, (b) los iones contra gonadotropina (c) un agente quelante suficiente para fijar los iones calcio presentes en el líquido que se quiere
10 examinar.

Otro objeto del invento es un procedimiento para la preparación de un reactivo para la determinación de gonadotropinas que comprende la adición a un agente seleccionado del grupo constituido por una suspensión acuosa de eritrocitos
15 sensibilizados con dicha hormona, una solución acuosa de antisuero contra dicha hormona, y una mezcla de ambos componentes, de un agente quelante suficiente para fijar los iones calcio presentes en el líquido que se quiera examinar.

Los dos componentes (a) y (b) se usan preferiblemente en una forma liofilizada y el agente quelante en una solución acuosa o liofilizado junto con uno de los componentes
20 a y B.

Otro objeto del invento es un procedimiento para la determinación de gonadotropinas combinando en un tubo de
25 reacción un antisuero contra dicha hormona, eritrocitos sensibilizados con dicha hormona y el líquido que se quiere examinar, y determinando si se produce aglutinación, caracterizado porque la determinación se realiza en presencia de un agente quelante suficiente para fijar los iones calcio
30 presentes en el líquido que se quiere examinar.



29

13302

Las conclusiones sobre la presencia o ausencia de

gonadotropinas deducidas de las determinaciones realizadas de esta manera son de confianza en todos los casos en que los resultados del método de ensayo conocido eran defectuosas o dudosas. Por tanto, se ha mejorado considerablemente la certeza del método de determinación, y se ha aumentado notablemente la exactitud que, sobre todo en el examen cuantitativo, supone una gran ventaja. Según sea la cantidad de antisuero que se use, pueden demostrarse fácilmente cantidades de aproximadamente 100 unidades y más de gonadotropina coriónica por litro de orina. Además, también es posible ahora realizar determinaciones exactas con orina que ha estado guardada durante algún tiempo, cosa que hasta ahora no había sido muy fácil. Otra ventaja más es que la adición de un agente quelante a la mezcla de reacción hace que se fije también cualquier cinc que pueda haber presente (que puede perturbar igualmente la determinación).

Como ejemplos de agentes quelantes adecuados se mencionan: ácido etilendiaminatetracético (abreviadamente EDTA) ácido cítrico, ácido tartárico, ácido glucurónico, ácido sacárico y sales convenientes de estos ácidos p.ejm. sales de metal alcalino, sales de amonio y amonio sustituidos, y además polietilenglicoles y poliaminocarboxilatos. Asimismo, pueden usarse para los fines presentes los compuestos relacionados con EDTA, tal como ácido metilaminodiacético, ácido (2-carboxi-fenil)-imino-diacético, ácido uramil-N,N-diacético, ácido nitrilotriacético y sales adecuadas de los mismos. Pero, preferiblemente, se usan EDTA, ácido cítrico y sales de metal alcalino y de

amiento de los mismos.

283302

29



5 El agente quelante puede añadirse a uno de los componentes de la mezcla de ensayo de antisuero y eritrocitos o a la mezcla misma antes de añadir el líquido que se quiere examinar. El agente quelante se añade usualmente en forma de una solución acuosa. Preferentemente, se añade el agente quelante sobre una solución del antisuero o sobre una suspensión de los eritrocitos antes de su liofilización.

10 Si se utilizan 0,4 ml. de una solución en un amortiguador fosfato de antisuero con un título de por ejemplo, 1000-5000, se añade preferiblemente 0,2 por ciento en peso de EDTA. Prácticamente en la totalidad de los casos, esta cantidad es del todo suficiente para fijar cualquier calcio presente en orina. El mencionado amortiguador fosfato puede prepararse, por ejemplo, disolviendo 2,9 gr. de fosfato potásico primario, 9,6 gr. de fosfato sódico y 4,5 gr. de cloruro sódico en agua destilada y completamente hasta volumen de 1l.

20 También se puede aplicar un amortiguador citrato en lugar del de fosfato, que puede servir al mismo tiempo como agente quelante.

25 Se han realizado numerosos experimentos comparativos, con muestras de orina de las que se tenía la seguridad que eran positivas, es decir, de mujeres embarazadas. Según la edad de la orina y la temperatura a que había estado guardada, el método conocido mencionado dio, en 5-10 por ciento de los casos examinados, un resultado dudoso o negativo. Todas estas muestras se examinaron otra vez por el método de acuerdo con el invento, acusando ahora

283302

29 M



tanto las muestras dudosas como las supuestas muestras negativas. un resultado claro y positivo.

A continuación se dan algunos ejemplos de la preparación de reactivos para la determinación presente.

5

EJEMPLO I

Se prepara una solución amortiguadora que contiene los siguientes compuestos por litro:

10

- 2,88 gr. de fosfato potásico primario
- 9,62 gr. de fosfato sódico secundario
- 4,5 gr. de cloruro sódico

sobre lo cual se añade

15

2,0 gr. de sal disódica de EDTA.

20

Después se prepara una solución de antisuero liofilizado de 0,05 por ciento en peso en la mencionada solución amortiguadora. Luego se añaden 0,4 ml. de esta solución antisuero a una suspensión liofilizada de eritrocitos de 1 por ciento, en volumen, sensibilizada con gonadotropina coriónica humana, en 0,25 ml. de agua destinada. La mezcla resultante puede usarse como reactivo para la determinación del embarazo. Para este fin se añaden al reactivo 0,1 ml. de la orina que se quiera examinar.

25

EJEMPLO II

30

Se disuelven 0,5 gr. de antisuero en 100 ml. de un amortiguador citrato que contiene 11,13 gr. de ácido cítrico y 8,53 gr. de hidróxido potásico por litro. Después de

283302



una división igual en 100 viales, se liofiliza esta solución. Antes de realizar la determinación, se añaden 10 ml. de agua destilada a cada vial. Después se añaden 0,4 ml. de esta solución a una suspensión liofilizada de eritrocitos sensibilizados de 1 por ciento, en volumen, en 0,25 ml. de agua destilada. Con este reactivo puede hacerse una determinación directa.

EJEMPLO III

Diez ml. de una suspensión de eritrocitos sensibilizados con gonadotropina de 10 por ciento en volumen, se re-suspenden en 33 ml. de agua destilada que contiene 0,9 % de cloruro sódico y 2 por ciento en peso de suero de conejo mientras se añade 66,7 mg. de sal disódica de EDTA. A continuación, se añaden 0,05 ml. de esta suspensión sobre una mezcla de una solución antisuero de 0,05 por ciento en peso en 0,4 ml. de la solución amortiguadora mencionada en el Ejemplo I. La mezcla resultante es adecuada como reactivo para la determinación de la correspondiente gonadotropina.

Esta solicitud que corresponde a la presentada en Holanda con fecha 15 de diciembre de 1961, bajo el número 272.588, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

283302

29



- N O T A -

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 siguientes:

1º. - Un procedimiento de preparación de un reactivo para la determinación de gonadotropinas, que comprende la adición a un agente elegido del grupo consistente en una suspensión acuosa de eritrocitos sensibilizados con dicha gonadotropina, una solución acuosa de un antisuero contra dicha hormona y una mezcla de ambos componentes de un agente de formación de quelatos suficiente para combinar los iones calcio presentes en el líquido a examinar.

2º. - Un procedimiento según el punto 1, caracterizado porque se añade un agente de formación de quelatos a una solución acuosa de antisuero contra gonadotropinas del corion después de lo cual la solución se liofiliza si se desea.

3º. - Un procedimiento según el punto 1, caracterizado porque se añade un agente de formación de quelatos a una suspensión acuosa de eritrocitos sensibilizada con gonadotropina del corion, después de lo cual la suspensión es liofilizada si se desea.

4º. - Un procedimiento para la determinación de la gonadotropina combinando en un tubo de reacción un antisuero contra dicha hormona, eritrocitos sensibilizados con dicha hormona y el líquido a examinar y determinando si ocurre aglutinación, caracterizado porque la determinación se realiza en presencia de un agente de formación de quelatos su-

283302 29 MAR 1963



ficiente para combinar los iones calcio presentes en el líquido a examinar.

5^o. - Procedimiento de preparación de un reactivo para la determinación de gonadotropinas.

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

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

10 Madrid, 29 MAR. 1963

P.A.

Acepto de Embargo
Por Orden

MIG/