

1 MAR



Nº 303.379

303379

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION

por VEINTE años en España, por "UN METODO DE -
PREPARAR UN REACTIVO PARA LA DETECCION SERO-
LOGICA DE LA GONADOTROFINA CORIONICA HUMANA
EN LA ORINA"

a favor de

ORTHO PHARMACEUTICAL CORPORATION

domiciliado en Raritan, New Jersey, EE.UU.

PRIORIDAD: de la solicitud de patente esta-
dounidense Nº 304.275 del 23 de
agosto de 1963.-

INVENTOR : Margaret Treacy, de nacionalidad
británica.

303379



5

La presente invención se refiere en general a un método de determinación serológica in vitro de gonadotrofina coriónica humana (llamada a continuación GCH), y más particularmente trata de un reactivo para la determinación serológica del embarazo por detección de la GCH en la orina, y del método de preparar el reactivo.

10

La GCH es producida durante el embarazo por la placenta y se encuentra poco tiempo después de la nidación en el suero y en la orina. La GCH es segregada en la orina de mujeres no embarazadas, con excepción de mujeres no embarazadas que padecen ciertas condiciones patológicas, tales como tumores histológicos coriónicos. Se considera generalmente que, excepción hecha de mujeres que padecen ciertas condiciones patológicas, la presencia de la GCH en la orina y en el

15

suero es un indicio seguro del embarazo. Un número de ensayos de embarazo anteriores se basan sobre métodos biológicos in vivo, de determinar la presencia de GCH. El ensayo de Aschheim-Zondek se basa sobre la capacidad de la GCH, inyectada subcutáneamente en ratones, de producir corpora lutea.

20

A pesar del hecho de que este ensayo es siempre exacto, actualmente no se usa extensamente debido a los intervalos largos antes de conseguir los resultados, debido a la dificultad de mantener un gran abastecimiento de animales de la edad requerida, y la necesidad de inyecciones múltiples. Otro inconveniente es que la toxicidad de la orina de ensayo causa la

25

muerte de un número considerable de animales. Otro ensayo biológico para determinar el embarazo, que se usa extensamente, se conoce como ensayo de Friedman. En este ensayo se usa como animal de prueba una coneja adulta que ha estado aislada

30

durante tres o cuatro semanas. Una muestra de la orina a en



303379

- 1 M

5

10

15

20

25

30

sayar es inyectada en la vena de la oreja de la coneja, y cuarenta y ocho horas después de la inyección se examinan los ovarios con respecto a folículos hemorrágicos rotos, que indican una reacción positiva. Una ventaja de este ensayo es que el animal no tiene que ser sacrificado, y puede ser usado nuevamente dentro de cuatro a seis semanas. El ensayo de Friedman elimina en gran parte las objeciones formuladas contra el ensayo de Aschheim-Zondek con ratones, y es casi tan exacto. Un inconveniente del ensayo de Friedman es que el costo del animal es elevado si el animal es sacrificado, y si no es sacrificado requiere un cuidado y mantenimiento prolongado.

En otro ensayo biológico para determinar el embarazo se usan ratas hembras inmaduras. La orina a ensayar se inyecta subcutáneamente en las ratas, y la mañana siguiente los animales son sacrificados. Los ovarios son disecados e inspeccionados con respecto a su ensanchamiento y la presencia de rubefacción o puntos rojos. Un inconveniente mayor de este ensayo es la dificultad que ofrece la diferenciación de un ovario negativo, levemente rosado, de un ovario positivo enrojecido, y sólo algunos técnicos prácticos pueden mantener una precisión elevada.

También se han usado ranas y sapos para ensayos tendientes a determinar el embarazo, pero estos animales son relativamente insensibles en comparación con ratones, ratas y conejos, de modo que frecuentemente es necesario concentrar la orina a ensayar a fin de aumentar la concentración de la GCH.

Una finalidad principal de la presente invención consiste en superar los inconvenientes de los ensayos de embarazo de la técnica anterior, basados sobre métodos biológicos,



303379-1

mediante la provisión de un método serodiagnóstico de determinar el embarazo.

5

Otra finalidad de la presente invención consiste en proveer un método serodiagnóstico de determinar el embarazo mediante la determinación in vitro de la GCH en la orina.

10

Otra finalidad más de la presente invención consiste en proveer un reactivo para ensayos serológicos, útil para determinar el embarazo, en forma de una combinación de GCH partículas de resina sintética, que comprende una suspensión de partículas de resina sintética capaces de adsorber proteína en su superficie que tiene GCH, cuyas características físicas han sido alteradas sin alterar sus características inmunológicas, adsorbida en la superficie de las partículas (llamadas a continuación reactivo de látex).

15

Otra finalidad más de la presente invención consiste en proveer un método serodiagnóstico de determinar el embarazo que no requiere equipos especiales y que puede ser realizado en pocos minutos.

20

De acuerdo con la presente invención se ha hecho el descubrimiento de que las dificultades inherentes a métodos biológicos de determinar in vivo el embarazo pueden ser superadas y que las finalidades de la presente invención pueden ser realizadas mediante la provisión de un reactivo de látex y un ensayo serológico para determinar in vitro el embarazo, basado sobre el uso del reactivo de látex en la determinación de GCH en la orina de mujeres embarazadas, que es sumamente exacto, requiere sólo unos pocos minutos para llevarlo a cabo, y no necesita equipos ni habilidades especiales para su interpretación correcta.

25

30

En el ensayo de la presente invención, los reacti-



303379

5 vos son el reactivo de látex y un antisuero de la GCH. El
 ensayo es un ensayo de inhibición y se efectúa mezclando el
 antisuero con una pequeña cantidad de la orina a ensayar, y
 mezclando luego el reactivo de látex con la mezcla antisue-
10 ro-orina. Si la orina a ensayar contiene GCH, se produce -
 una reacción entre la GCH y el anticuerpo del antisuero de
 modo que el anticuerpo no está disponible para reaccionar con
 la GCH en las partículas del reactivo de látex. Si la orina
 ensayada no contiene GCH, la GCH en las partículas reacciona
15 con el anticuerpo del antisuero, y ello es puesto en eviden-
 cia por la aglutinación de las partículas del reactivo de lá-
 tex.

 El antisuero se produce inyectando en conejos GCH
 parcialmente purificada, obtenida de la orina de mujeres em-
15 barazadas. Después de aproximadamente cinco semanas, los co-
 nejos son sangrados y los sueros se recogen. El suero de ca-
 da conejo es ensayado contra GCH de concentración conocida y
 se juntan los antisueros que dan una reacción positiva con -
 una concentración baja de GCH. La concentración del anticuer-
20 po en los antisueros juntados es determinada mediante el uso
 de GCH de concentración conocida, de modo de determinar con
 exactitud la cantidad de GCH requerida para reaccionar comple-
 tamente con el anticuerpo en los antisueros combinados (E.A.
 Kabat y M.M. Mayer, Experimental Immunochimistry; 2ª edición,
25 1961, página 22-90).

 El reactivo de látex se prepara, agregando una so-
 lución acuosa de GCH lentamente y con agitación constante a una
 suspensión de partículas de una resina sintética capaz de ad-
 sorber proteína en su superficie, lo que resulta en una combi-
30 nación de GCH y partículas de resina en la cual la GCH está

303379



adsorbida en las partículas.

Las partículas son aproximadamente esféricas y tienen un diámetro promedial dentro de la gama desde aproximadamente 0,07 micrón hasta aproximadamente 0,90 micrón; el diámetro promedial preferido es de aproximadamente 0,81 micrón. La concentración de las partículas en el reactivo de látex puede estar dentro de la gama de aproximadamente un 0,5 a aproximadamente un 1,5 por ciento ponderal; empero, se prefiere usar una suspensión cuya concentración de partículas es del orden de aproximadamente un 0,8 hasta aproximadamente un 1,2 por ciento ponderal. Si la concentración de partículas en la suspensión es inferior a aproximadamente un 0,5 por ciento ponderal, la aglutinación de las partículas no se produce fácilmente; y cuando se produce, no se observa fácilmente. Si la concentración de partículas en la suspensión es superior a aproximadamente un 1,5 por ciento ponderal, el número de partículas es demasiado grande para poder determinar con exactitud si la aglutinación se ha producido o no.

La GCH usada en la preparación de la solución de GCH debe ser relativamente pura. Ha resultado ser satisfactoria una GCH que tiene, según análisis, por lo menos aproximadamente 1700 y preferentemente entre aproximadamente 1700 y aproximadamente 3000 unidades internacionales por miligramo.

La GCH no debe tener, según análisis, menos de aproximadamente 1700 unidades internacionales por miligramo ya que, de lo contrario, la cantidad de proteína extraña presente con la GCH es tal que una cantidad significativa de la misma es también adsorbida en las partículas, estorbando el ensayo de inhibición por impedir la aglutinación.

La solución de GCH usada para preparar el reactivo -



303379

1 MAR

5 de látex contiene una cantidad de GCH dentro de la gama de
aproximadamente 720 hasta aproximadamente 900 unidades inter
nacionales de GCH por mililitro. La cantidad preferida es -
de aproximadamente 840 unidades internacionales de GCH por -
10 mililitro. Si la solución de GCH contiene menos de aproxima
damente 720 unidades internacionales de GCH por mililitro, -
las partículas no están plenamente revestidas inmunológicamen
te de modo que cierta parte de la superficie de las partículas
queda expuesta y adsorbe proteína extraña de la orina de en-
15 sayo, estorbando así la reacción. Si la solución de GCH con-
tiene más de aproximadamente 900 unidades internacionales de
GCH por mililitro, hay un exceso de GCH que queda en el reac
tivo de látex como GCH no adsorbida que reacciona preferente
mente con el anticuerpo de GCH del antisuero, de modo que el
20 anticuerpo no está disponible para reaccionar con la GCH del
reactivo de látex e impide así la aglutinación que, de no ser
así, se hubiera producido. La suspensión de látex que ha de
ser tratada con GCH, contiene aproximadamente un 1,8 hasta
un 2,2 por ciento ponderal de partículas.

20 Para que el reactivo de látex funcione satisfacto--
riamente en el ensayo de inhibición, la GCH del reactivo de
látex debe ser capaz de reaccionar rápida y completamente -
con los anticuerpos del antisuero y producir una aglutinación
fácilmente observable de las partículas del reactivo de látex.
25 Ello requiere la "alteración" de la GCH. La alteración efectua
un cambio en las características físicas de la GCH, pero no -
modifica las características inmunológicas de la GCH. Esta al
teración puede ser realizada, envejeciendo el reactivo de lá-
tex o simulando y acelerando el proceso de envejecimiento me-
30 diante varios tratamientos que incluyen el calentamiento del



303378

reactivo de látex o la aplicación de tratamientos tanto digestivos enzimicos como térmicos a la solución de la GCH, antes de su adsorción en las partículas de látex o en el reactivo de látex.

5 La alteración del reactivo de látex puede ser efectuada, calentando el material lentamente hasta una temperatura de aproximadamente 96°C., enfriándolo hasta aproximadamente 50°C y manteniéndolo a esta temperatura durante unas cuatro hasta seis semanas; o llevando el material lentamente hasta una temperatura de aproximadamente 50°C. y manteniéndolo a esta temperatura durante un período de aproximadamente dos hasta aproximadamente tres meses.

10 La alteración del reactivo de látex por tratamiento enzimico y tratamiento térmico puede ser realizada, agregando el reactivo de látex, que tiene un pH dentro de la gama de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 9,0, y preferentemente 8,2 una solución acuosa de tripsina conteniendo, por peso, la décima parte del peso de la GCH adsorbida en las partículas de látex en el reactivo de látex, llevando el reactivo de látex lentamente a una temperatura de 50°C, y manteniéndolo a esta temperatura durante un periodo de aproximadamente dos hasta aproximadamente cuatro semanas.

15 La alteración mediante el uso de una combinación de enzima y calor también puede ser efectuada mediante el tratamiento enzimico de la GCH antes de su adsorción en las partículas de látex, y su subsiguiente tratamiento térmico. De acuerdo con este método, una solución acuosa de tripsina, ajustada a un pH de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,2 y preferentemente un pH de aproximadamente 7,1 se agrega a una solución acuosa de GCH que ha sido ajustada al mismo pH, la solu-

20

25

30



303379

1 MA

5 ción resultante se somete a calor, operación que comprende
calentarla hasta una temperatura de aproximadamente 37°C y
mantenerla a esta temperatura durante aproximadamente una ho
ra, la solución de GCH se amortigua hasta un pH del orden de
aproximadamente 8,0 a aproximadamente 9,0 y preferentemente
8,7, la solución de GCH alterada se agrega lentamente con -
agitación a la suspensión de látex que también ha sido amor-
tiguada hasta un pH del orden de aproximadamente 8,0 a apro-
ximadamente 9,0, preferentemente 8,7, y el material resultan
10 te se somete a calor llevándolo lentamente hasta una tempera
tura de aproximadamente 50°C y manteniéndolo a esta tempera
tura durante aproximadamente dos hasta aproximadamente cua-
tro semanas.

15 Después de la alteración del reactivo de látex, és-
te es amortiguado hasta un pH del orden de aproximadamente -
7,8 hasta aproximadamente 8,8. Si el pH es inferior a apro-
ximadamente 7,8 o superior a aproximadamente 8,8, la estabi-
lidad del reactivo disminuye al punto de hacer insatisfacto-
ria la exactitud del ensayo de inhibición.

20 El reactivo de látex preparado de la susodicha ma-
nera tiene aproximadamente 36 hasta aproximadamente 45 unida
des internacionales de GCH por miligramo de peso de las par-
tículas de látex. La cantidad preferida es de aproximadamente
40 hasta aproximadamente 42 unidades internacionales por mi-
25 ligramo de peso de las partículas de látex. Si la cantidad es
inferior a aproximadamente 36 unidades internacionales de GCH
por miligramo de peso de las partículas de látex, la superfi-
cie expuesta, inmunológicamente no revestida, de las partícu-
las es tan grande que proteína extraña proveniente de la ori-
30 na de ensayo puede ser adsorbida en la superficie de las par-



303373-1 MAR 1951

5 tículas y estorbar la reacción que, de no ser así, se hubiese
producido. Si la cantidad es superior a aproximadamente 45 un-
dades internacionales de GCH por miligramo de peso de las par-
tículas de látex, está presente un exceso de GCH que no es ad-
sorbido en las partículas, y la GCH no adsorbida reacciona --
preferentemente con el anticuerpo de GCH del antisuero, de mo-
do que el anticuerpo no está disponible para reaccionar con -
la GCH del reactivo de látex y por tanto no se produce la aglu-
tinación que, de no ser así, se hubiera producido.

10 Las resinas sintéticas que se prestan para adsorber
la GCH en la preparación del reactivo de látex deben ser ca-
paces de adsorber proteína, y deben ser capaces de ser prepa-
radas en forma esférica o casi esférica con un diámetro pro-
medial de aproximadamente 0,07 hasta aproximadamente 0,90 mi-
crón. Ejemplos de resinas sintéticas convenientes son las re-
15 sinas poliestirénicas y polimeta-crílicas.

Los siguientes ejemplos de la preparación del reac-
tivo de látex se ofrecen como ilustraciones específicas. Sin
embargo, ha de quedar entendido que la invención no se limi-
ta a los detalles específicos de los ejemplos.

20

EJEMPLO 1

3,6 ml. de una suspensión de partículas de poliesti-
reno, en la cual las partículas tenían un diámetro promedial
de 0,81 micrón y la concentración de partículas era del 28,32
25 por ciento ponderal; se agregaron a 46,4 ml de una solución
amortiguadora acuosa que tenía un pH de 8,2. La solución --
amortigua_dora se preparó disolviendo 6,675 g de borato sód-
ico, 8,04 g de ácido bórico y 9,0 g de cloruro sódico en agua
destilada suficiente para llevar el volumen a un litro. A la
30 suspensión amortiguada se agregaron lentamente, con agitación



303379

5 constante, 50 ml de una solución acuosa de GCH conteniendo -
40.000 unidades internacionales de GCH, que se había amorti-
guado hasta un pH de 8,2 con la misma solución amortiguadora
que la arriba descrita. El material resultante se llevó len-
tamente a una temperatura de 50°C y se mantuvo a esta tempe-
ratura durante un período de tres meses.

EJEMPLO 2

10 El reactivo de látex se preparó como en el ejemplo
1, excepto que inmediatamente después de agregar la solución
de GCH amortiguada a la suspensión de poliestireno amortigua-
da, la mezcla se llevó lentamente hasta una temperatura de -
96°C, con frecuente agitación, se enfrió luego prontamente -
hasta una temperatura de 50°C, y se mantuvo a esta temperatu-
ra durante un período de seis semanas.

15 EJEMPLO 3

20 3,6 ml de una suspensión de partículas de poliesti-
reno cuyas partículas tenían un diámetro promedial de 0,81 -
micrón, se agregaron lentamente a 36,4 ml de la misma solu-
ción amortiguadora que la usada en el ejemplo 1. A la suspen-
sión amortiguada se agregaron, con agitación constante, 50 -
ml de una solución acuosa de GCH, amortiguada a un pH de 8,2
con la misma solución amortiguadora que la usada en el ejem-
plo 1, y conteniendo 40.000 unidades internacionales de GCH
la adición se efectuó lentamente. El material resultante se
25 llevó hasta una temperatura de 5°C y se mantuvo a esta tempe-
ratura durante 16 horas. Luego se agregaron a la suspensión
amortiguada, con agitación, 10 ml de una solución acuosa de
tripsina al 1 por ciento. El material resultante se llevó -
hasta una temperatura de 50°C y se mantuvo a esta temperatu-
30 ra durante cuatro semanas.



EJEMPLO 4

303379

5 42.000 unidades internacionales de GCH se disolvie
ron en 4,5 ml de una solución amortiguadora acuosa que tenía
un pH de 7,1. La solución amortiguadora se preparó disol--
viendo 1,907 g de borato sódico, 11,133 g de ácido bórico,
9,0 g de cloruro sódico, y 5,54 g de cloruro cálcico en agua
destilada suficiente para llevar el volumen a un litro. A
la solución de GCH amortiguada se agregó lentamente, con agi
tación, una solución acuosa de tripsina preparada disolvien
10 do en agua destilada una cantidad de tripsina cristalina --
igual a la décima parte del peso de la GCH. La solución --
resultante se llevó hasta una temperatura de 37°C y se man
tuvo a esta temperatura durante una hora, y luego se agre--
gó una solución amortiguadora, teniendo la composición de la
15 solución amortiguadora del ejemplo 1, en cantidad suficiente
para llevar el volumen a 50 ml. La solución de GCH diluída
tenía así un pH de 8,2. La solución de GCH amortiguada se
agregó lentamente, con agitación constante, a 50 ml de una
suspensión al 2 por ciento ponderal de partículas de poli--
20 estireno cuyo diámetro promedial era de 0,81 micrón. La --
suspensión se amortiguó a un pH de 8,2 con un amortiguador
acuoso que tenía la misma composición que el del ejemplo 1.
El material resultante se llevó lentamente hasta una tempera
tura de 50°C. y se mantuvo a esta temperatura durante tres
25 semanas.

EJEMPLO 5

30 42.000 unidades internacionales de GCH se disolvie
ron en 4,5 ml de agua destilada que se había ajustado a un
pH de 7,1. Una cantidad de tripsina cristalina igual a la
décima parte del peso de la GCH, se disolvieron en 20 ml de



303379-1 MAR

5 agua destilada que se había ajustado a un pH de 7,1. La so-
lución enzimica se agregó a la solución de GCH, y la solu-
ción resultante se mantuvo a una temperatura de 57°C durante
una hora y luego se diluyó hasta 50 ml con agua destilada -
que había sido ajustada hasta un pH de 9 con solución acuo-
sa de hidróxido sódico. La solución diluída se agregó a 50
10 ml de una suspensión al 2 por ciento ponderal de partículas
de poliestireno teniendo un diámetro promedial de 0,81 micrón
que se había dializado durante la noche empleando 100 volú-
menes de agua destilada ajustada a un pH de 9,0 con solu-
ción acuosa de hidróxido sódico. El material resultante se
llevó a una temperatura de 50°C. y se mantuvo a esta tempe-
ratura durante diez días.

EJEMPLO 6

15 25.110 unidades internacionales de GCH se disolvie-
ron en 4,5 ml de agua destilada que se había ajustado a un
pH de 7,4. Una cantidad de tripsina cristalina igual a la
décima parte del peso de la GCH, se disolvió en 0,5 ml. de
agua destilada que se había ajustado a un pH de 7,4. La --
20 solución enzimica se agregó a la solución de GCH, y la solu-
ción resultante se mantuvo a una temperatura de 37°C., du-
rante una hora y luego se diluyó hasta 50 ml. con amortigua-
dor de borato 0,1 M, pH 8,68, conteniendo un 10 por ciento
de sucrosa.

25 La solución diluída se agregó a 50 ml. de una dis-
persión al 2 por ciento volumétrico de partículas de resina
polimetacrílica con un diámetro promedial de 0,5 micrón, que
había sido dializado durante la noche empleando tres litros
de agua destilada.

30



33379-1 MAR.

EJEMPLO 7

5.000 unidades internacionales de GCH se disolvie--
ron en 4,5 ml de agua destilada que se había ajustado a un -
pH de 7,4. Una cantidad de tripsina cristalina igual a la -
5 décima parte del peso de la GCH se disolvió en 0,5 ml. de -
agua destilada que había sido ajustada a un pH de 7,4. La so-
lución enzimica se agregó a la solución de GCH, y la solu- -
ción resultante se mantuvo a una temperatura de 37°C durante
una hora y luego se diluyó hasta 50 ml con amortiguador de -
10 borato 0,1 M, pH 8,68 conteniendo un 10 por ciento de sucrosa.

La solución diluída se agregó a 50 ml de una sus--
pensión al 2 por ciento volumétrico de partículas de látex
poliestirénico, teniendo las partículas un diámetro prome--
dial de 0,15 micrón, que había sido dializada durante la no-
15 che, empleando 37,85 litros de agua destilada.

EJEMPLO 8

100 ml de una suspensión al 0,1 por ciento de par-
tículas de látex poliestirénico se prepararon en un amorti-
guador de borato 0,2 M teniendo un pH de 8,2, las partículas
20 tenían un diámetro promedial de 0,81 micrón. 100 ml de solu-
ción de GCH conteniendo 4.000 unidades internacionales de -
GCH en amortiguador de borato teniendo un pH de 8,2 se agre-
garon lentamente, con agitación, a la suspensión de látex -
poliestirénico. La combinación de GCH y látex poliestiréni-
25 co se almacenó, sin perturbarla, a 5°C durante seis meses -
para permitir la sedimentación. Luego se quitaron 180 ml de
amortiguador sobrenadante y las partículas se suspendieron -
nuevamente en los restantes 20 ml de amortiguador sobrena--
dante, para proporcionar una concentración del 1 por ciento.

30 El reactivo de látex preparado de acuerdo con los



3033

ejemplos precedentes se ensaya, para verificar si es aceptable para ser usado en la determinación de GCH mediante un ensayo serológico de inhibición, empleando el siguiente procedimiento en dos operaciones: en la primera operación se prepara una serie de diluciones de un potente antisuero de GCH conocido, en imidazol como diluyente. El diluyente de imidazol se prepara, agregando 6 ml de ácido clorhídrico 0,1 N a 25 ml de solución acuosa de imidazol 0,2 M, diluyendo hasta un volumen de 100 ml con agua destilada, agregando 0,7 g de cloruro sódico, 0,032 g de salicilato sódico, 20 ml de una solución acuosa al 30 por ciento de albúmina bovina, y una cantidad de etilmercuritiosalicilato sódico tal que la concentración de la solución, con respecto a la misma, es de 1:10.000 v/v. Alternativamente, el diluyente de imidazol puede ser preparado agregando 1,36 ml de ácido clorhídrico 0,1 N a 0,3407 g de imidazol y 7,5 g de glicina, y diluyendo con agua destilada hasta un volumen de un litro. Una gota de cada dilución de antisuero se mezcla, sobre una placa de color oscuro, con una gota del diluyente de imidazol. Dos gotas del reactivo de látex se colocan en la placa adyacentemente a dicha mezcla, y luego se mezclan con la mezcla de dilución de antisuero y diluyente de imidazol. Frontamente después de completar la mezcla, la placa se mece muy lenta y suavemente y la mezcla se examina a simple vista para verificar el desarrollo de aglutinación. En la segunda operación se usa, en un ensayo de inhibición con el reactivo de látex y una solución de GCH, una dilución igual a la mitad de la mayor dilución de antisuero que se encuentra, de acuerdo con la primera operación, capaz de iniciar la aglutinación en 15 segundos y completarla dentro de dos minutos después del comienzo de mecer la pla



30

1 MAR 1947

5

10

15

20

25

30

ca. En el ensayo de inhibición, una gota de la dilución de -
antisuero es colocada sobre una placa de color oscuro y es -
mezclada durante 30 segundos con una gota de una solución en
orina proveniente de una mujer no embarazada, conteniendo 10
unidades internacionales de GCH por ml. Dos gotas del reacti
vo de látex a ensayar se mezclan con la mezcla de antisuero
y solución de GCH. Prontamente después de completar esta mez
cladura, la placa se mece lenta y suavemente, y se observa -
para ver si se produce una aglutinación. El reactivo de lá--
tex es aceptable para ser usado en el ensayo de inhibición -
de la presente invención si, en la segunda operación, no se -
observa la aglutinación de sus partículas dentro de dos minu
tos después de haberse completado la mezcladura final y haber
se iniciado la mecedura de la placa.

A continuación se ofrece un ejemplo de la prepara--
ción y normalización del antisuero usado en el ensayo para -
determinar el embarazo, con arreglo a la presente invención:

Se efectúa en un conejo una inyección intramuscular
inicial de una emulsión de 1 ml de una solución acuosa al 0,9
por ciento de cloruro sódico conteniendo 50.000 unidades in-
ternacionales de GCH y un volumen igual del adyuvante de - -
Freund (J. Freund, Ann. Rev. Microbiol, 1947, 1:291). Tres -
inyecciones intravenosas de solución de GCH se aplican después
de seis semanas, en intervalos de dos días. Cada inyección -
adicional comprende 1.000 unidades internacionales de GCH en
solución en 1 ml de solución acuosa al 0,9 por ciento de clo-
ruro sódico. Catorce días después de la última inyección, los
conejos son sangrados. Catorce días después de la sangría, los
conejos son inyectados por vía intravenosa en cada uno de tres
días consecutivos con 1 ml de una solución acuosa de cloruro

30337

- 1 MAR



-sódico al 0,9 por ciento, conteniendo 3.300 unidades internacionales de GCH, y los conejos son sangrados nuevamente un mes después de la sangría inicial.

5 A fin de poder obtener una dilución de antisuero que tenga una concentración de anticuerpo apropiada para ser usada en el ensayo de inhibición de la presente invención, la concentración de anticuerpo del antisuero se determina en un procedimiento en dos operaciones: una primera operación para determinar la concentración aproximada del anticuerpo en el suero, y una segunda operación para determinar la concentración del anticuerpo en el suero, con mayor precisión.

10 En la primera operación, el suero proveniente de cada sangría se diluye con diluyente de imidazol para proveer soluciones conteniendo una parte de suero por 100, 200, 300, 400 15 500 y 1000 partes de diluyente de imidazol. Una gota de cada dilución de suero se coloca en una placa negra separada y una gota de diluyente de imidazol se agrega a cada gota de dilución de suero y se mezcla con la misma. Dos gotas del reactivo de látex, que es aceptable para ser usado en el ensayo de inhibición, según determinado de acuerdo con el susodicho procedimiento, se colocan en una placa oscura adyacentemente a cada dilución de suero y se mezclan con ésta. Prontamente después de completar la mezcla, cada placa se mece muy lenta y suavemente, y la mezcla se observa con respecto al desarrollo de 20 aglutinación. Se combinan los sueros que aglutinan las partículas del reactivo de látex completamente dentro de dos minutos a una dilución de 1:300 o una dilución mayor.

25 En la segunda operación, diluciones progresivamente mayores del antisuero combinado en diluyente de imidazol son preparadas y ensayadas de la manera arriba descrita, a fin de 30

- 1 MAR.

3379



5

poder determinar la mayor dilución que exhiba una aglutinación completa dentro de dos minutos. El suero combinado se diluye entonces con el diluyente de imidazol hasta una dilución igual a la mitad de la mayor dilución que exhibe una aglutinación completa dentro de dos minutos, y la conveniencia de esta dilución se verifica mediante el siguiente ensayo de inhibición.

10

15

20

25

30

Se prepara una dilución de GCH en orina proveniente de una mujer no embarazada, conteniendo 10 unidades internacionales de GCH por ml. Una gota de cada dilución de antisuero se coloca en una placa de color oscuro, y una gota de la solución de GCH se agrega a cada dilución de antisuero. Las mezclas se agitan durante 30 segundos, usando una varilla aplicadora. Dos gotas del reactivo de látex que ha demostrado ser aceptable para ser usado en el ensayo de inhibición de la presente invención, se agregan a cada mezcla y se mezclan con la mezcla de antisuero y solución de GCH, usando una varilla aplicadora. Prontamente después de completar la mezcladura, cada placa se mece lenta y suavemente y las mezclas se observan con respecto a la aglutinación. La dilución de antisuero, que no produce ninguna aglutinación observable dentro de dos minutos después de completarse la mezcladura final y haberse iniciado la mecedura de la placa, se usa como antisuero normalizado en el ensayo para determinar el embarazo, de acuerdo con la presente invención. Si con la solución de GCH conteniendo 10 unidades internacionales de GCH por ml, no se logra la inhibición completa, indicada por la falta de aglutinación dentro del período de prueba de dos minutos, la dilución del antisuero se ajusta por adición de antisuero concentrado o por dilu-



303379

- 1 MAR

ción del antisuero, de modo de lograr la inhibición completa cuando en el susodicho ensayo se usa una solución conteniendo 10 unidades internacionales de GCH por ml.

5 El ensayo de inhibición de la presente invención, para la determinación serológica in vitro de GCH en la orina, se efectúa mediante el uso del reactivo de látex de la presente invención de acuerdo con el siguiente procedimiento:

10 Una gota de antisuero de GCH normalizado se coloca en una placa de color oscuro. Una gota de la orina a ensayar se agrega al antisuero, y la mezcla se agita durante 30 segundos con una varilla aplicadora. Dos gotas del reactivo de látex se colocan en la placa cerca de la mezcla de antisuero y orina, y se mezclan con la mezcla de orina y antisuero usando una varilla aplicadora. Prontamente después de completarse la mezcla, la placa se mece muy lenta y suavemente, y la mezcla se observa con respecto al desarrollo de aglutinación. La presencia de una aglutinación observable dentro de exactamente dos minutos después de completarse la mezcladura final y haberse iniciado la mezcladura de la placa, indica la ausencia de GCH en la orina de ensayo; la ausencia de aglutinación al término del mismo período de tiempo establece la presencia de GCH en la orina de ensayo. Con cada ensayo se efectúa un ensayo testigo separado, usando en lugar de orina una gota de solución de cloruro sódico fisiológica.

25 Aunque la invención ha sido descrita con referencia a formas específicas de realización, ha de quedar entendido que no se limita a las mismas, sino que ha de ser interpretada en sentido amplio, y limitada solamente por el

30



3.337-9117

alcance de las reivindicaciones siguientes

REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descrito y determinado la naturaleza del presente invento y la forma en que el mismo puede ser llevado a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivos:

5

1. Un método de preparar un reactivo para la detección serológica de la gonadotropina corionica humana en la orina, cuyo reactivo contiene partículas de resina sintética capaces de adsorber proteina, que tienen gonadotropina corionica humana (GCH) adsorbida en ellas, caracterizado porque comprende alterar la GCH en cuanto a sus características físicas conservando a la vez sus características inmunológicas.

10

15

2. Un método de preparar un reactivo para la detección serológica de la gonadotropina corionica humana en la orina, cuyo reactivo contiene partículas de resina sintética capaces de adsorber proteina, que tienen GCH adsorbida en ellas, caracterizado por comprender las operaciones de (1) agregar una solución acuosa de GCH, teniendo un pH dentro de la gama de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 9,0, a una suspensión de dichas partículas de resina sintética que tiene un pH dentro de la gama de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 9,0, dichas partículas de resina sintética teniendo un diámetro promedial dentro de la gama de aproximadamente 0,07 a aproximadamente 0,90 micrón, la concentración de dichas partículas en la suspensión siendo del orden de aproximadamente un 0,5 hasta aproximadamente un 1,5 por ciento ponderal, y la cantidad de GCH en la solución acuosa de GCH siendo del orden de aproximadamente 720 hasta apro-

20

25

30

303379-1



5 ximadamente 900 unidades internacionales de GCH por mililitro de la suspensión de partículas; (2) calentar la suspensión de partículas, que tienen GCH adsorbida en ellas, hasta una temperatura de aproximadamente 96^o C; (3) enfriar la suspensión hasta aproximadamente 50^o C; y (4) mantener la suspensión a aproximadamente 50^o C durante un período de aproximadamente dos a aproximadamente tres meses.

10 3. Un método de preparar un reactivo para la detección serológica de la gonadotropina corionica humana en la orina, cuyo reactivo contiene partículas de resina sintética capaces de adsorber proteína, teniendo GCH adsorbida en ellas, caracterizado por comprender las operaciones de (1) agregar una solución acuosa de GCH, teniendo un pH dentro de la

15 gama de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 9,0 a una suspensión de dichas partículas de resina sintética que tiene un pH dentro de la gama de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 9,0, dichas partículas de resina sintética teniendo un diámetro promedial del orden de aproximadamente

20 0,07 hasta aproximadamente 0,90 micrón, la concentración de partículas en la suspensión siendo del orden de aproximadamente un 0,5 hasta aproximadamente un 1,5 por ciento ponderal, y la cantidad de GCH en la solución acuosa de GCH siendo del orden de aproximadamente 720 hasta aproximadamente 900

25 unidades internacionales de GCH por mililitro de la suspensión de partículas; (2) agregar a la suspensión de partículas que tienen GCH adsorbida en ellas, una solución de tripsina conteniendo, por peso, la décima parte del peso de la GCH adsorbido en las partículas en la suspensión; (3) calentar lentamente la suspensión hasta una temperatura de 50^o C;

30 (4) mantener la suspensión a 50^o C durante un periodo de

353379¹



aproximadamente dos hasta aproximadamente cuatro semanas.

4. Un método de preparar un reactivo para la detección serológica de la gonadotropina corionica humana en la orina, cuyo reactivo contiene partículas de resina sintética capaces de adsorber proteina, teniendo GCH adsorbida en ellas, caracterizado por comprender las operaciones de (1) agregar una solución acuosa de tripsina, teniendo un pH del orden de aproximadamente 6,8 hasta aproximadamente 7,2 a una solución acuosa de GCH que tiene un pH del orden de aproximadamente 6,8 hasta aproximadamente 7,2; (2) calentar la solución de tripsina y GCH hasta una temperatura de aproximadamente 37°C (3) mantener la temperatura a aproximadamente 37°C durante aproximadamente una hora; (4) ajustar el pH de la solución de modo que esté dentro de la gama de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 9,0; (5) agregar la solución de GCH a una suspensión de dichas partículas de resina sintética teniendo un pH del orden de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 9,0, las partículas de resina sintética teniendo un diámetro promedial dentro de la gama de aproximadamente 0,07 hasta aproximadamente 0,90 micrón, la concentración de partículas en la suspensión siendo del orden de aproximadamente 0,50 hasta aproximadamente un 1,5 por ciento ponderal, y la cantidad de GCH en la solución acuosa de GCH siendo del orden de aproximadamente 720 hasta aproximadamente 900 unidades internacionales por mililitro de la suspensión de partículas; (6) calentar la suspensión de partículas, que tienen GCH adsorbida en ellas, hasta una temperatura de aproximadamente 50°C; y (7) mantener la suspensión a aproximadamente 50°C durante un período de aproximadamente dos hasta aproximadamente cuatro semanas.

5

10

15

20

25

30



303379 -1 MA

5 5. Un método de preparar un reactivo para la detección serológica de la gonadotropina corionica humana en la orina, cuyo reactivo contiene partículas de resina sintética capaces de adsorber proteina, teniendo GCH adsorbido en ellas, caracterizado por comprender las operaciones de: (1) agregar una solución acuosa de GCH, teniendo un pH dentro de la gama de aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 9,0, a una suspensión de dichas partículas de resina sintética que tiene un pH dentro de la gama de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 9,0, dichas partículas de resina sintética teniendo un diámetro promedial del orden de aproximadamente 0,07 hasta aproximadamente 0,90 micrón, la concentración de las partículas en la suspensión siendo del orden de aproximadamente un 0,5 hasta aproximadamente un 1,5 por ciento ponderal, y la cantidad de GCH en la solución acuosa de GCH siendo del orden de aproximadamente 720 hasta aproximadamente 900 unidades internacionales de GCH por mililitro de suspensión de partículas; y (2) mantener la suspensión de partículas, que tiene GCH adsorbida en ellas, a una temperatura de aproximadamente 5°C durante aproximadamente seis meses.

10 20 25 6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque dichas partículas son partículas de poliestireno que tienen preferentemente un diámetro promedial de 0,81 micrón.

7. Se reivindica por último, como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención cuyo registro se solicita: "UN METODO DE PREPARAR UN REACTIVO PARA LA DETECCION SEROLOGICA DE LA GONADOTROFINA CORIONICA HUMANA EN LA ORINA".

30 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la pre-



3 3379

sente memoria, que consta de veinticuatro páginas mecanogra-
fiadas.

Madrid, 22 Agosto 1964

ALFONSO UNGRIA

p.p.