

P - 34.712

OA/4895-627



338201

Memoria descriptiva

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de N. V. ORGANON

entidad / de nacionalidad holandesa

con domicilio en Kloosterstraat 6, Oss, Holanda

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE ERITROCITOS
APROPIADOS PARA LA DETERMINACION INMUNOQUIMICA DE AN
TIGENOS"

26 APR 1967



5 La presente invención se refiere a un procedi-
miento para perfeccionar las propiedades mecánicas de los
eritrocitos, haciéndose adecuados para ser comprimidos en
tabletas, u otras formas sólidas de dosis unitaria, sin
perder su aptitud para ser usados como auxiliares en de-
terminaciones inmunoquímicas.

10 Es sabido que los eritrocitos de mamíferos, ta-
les como ganado vacuno, caballos, ovejas, conejos, así co
mo pollos y seres humanos, se pueden usar como auxiliares
en determinaciones inmunoquímicas basadas en la reacción
de un antígeno con su anticuerpo. Los eritrocitos son apli-
cados, por ejemplo, como vehículo de antígeno, por ejemplo
gonadotropina coriónica humana (GCH), como se describe en
Acta Endocrinologica, 35, 261 (1960), gonadotropina del -
15 suero, hormona del crecimiento (véase Nature, 182, 951 --
(1958), y además albúmina del suero, gamma globulina, in-
sulina, hormona luteinizadora y toxoide del tétanos.

20 S. V. Boyden indica, en Proc. Soc. Exp. Biol. &
Med., 73, 289 (1950), que las propiedades de adsorción de
la superficie de los eritrocitos se perfeccionan mucho --
por tratamiento con un agente curtiente o un mordiente, -
permitiendo que el antígeno se una mucho mejor a los eri-
trocitos.

25 Se ha descrito en la literatura el uso de los -
siguientes agentes curtientes o mordientes: inulina, tani-
no, hidroquinona, bis-diazobencidina (véase, por ejemplo,
Fed. Proc., 17, 461 (1953); formalina (véase, por ejemplo,
Schweiz, Z. Path. Bakt., 21, 1043 (1958), acetaldehído, -
aldehído del ácido piruvico, y glioxal. También se ha apli-
30 cado ya el tratamiento sucesivo de los eritrocitos con di-

22.4.67

- 2 -

338201

26 ABR.

ferentes agentes curtientes y mordientes, por ejemplo un tratamiento previo con formalina, seguido por reacción - con tanino (véase Wide y Gemzell, en Acta Endocrinológica, ya mencionada antes).

5 En los últimos pocos años han aparecido diversas publicaciones sobre los ensayos de embarazo a efectuar en laboratorio, donde se hace uso de eritrocitos previamente tratados con un agente curtiente o mordiente, y sensibilizados con GCH. Su reacción con el antisuero homólogo puede ser evitada por la GCH presente en la orina a examinar, provocando la formación de un esquema específico de sedimentación de los eritrocitos sobre el fondo del recipiente de reacción.

15 Hasta ahora, los eritrocitos sensibilizados después del tratamiento previo han sido almacenados como sus suspensión acuosa, pero preferiblemente en forma secada por congelación. Sin embargo, los eritrocitos son partículas muy inestables, y la conservación de estos vehículos ha requerido ya mucho estudio. Los eritrocitos tratados previamente con un mordiente son menos inestables, y se pueden secar fácilmente por congelación, y en estado secado por congelación son estables durante un tiempo bastante largo. Sin embargo, se necesita una forma de presentación en la que los eritrocitos se puedan manipular bien, siendo al mismo tiempo estables, y conservando todas sus propiedades esenciales para efectuar los métodos de determinación inmunoquímica.

30 Sorprendentemente, se ha hallado ahora un método para preparar eritrocitos adecuados para determinaciones inmunoquímicas de antígenos, tratando los eritrocitos



5 con uno o más agentes curtientes, seguido por sensibiliza-
ción con el antígeno, caracterizado porque la última eta-
pa de la sensibilización se efectúa en presencia de for-
maldehído, en concentración menor que 2 % (peso/volumen),
a un pH de 5,5 a 8. Las propiedades mecánicas de los eri-
trocitos así tratados se han perfeccionado en grado tal -
que se pueden comprimir en forma de tabletas, conservando
los eritrocitos su aptitud para ser usados como auxilia-
res en reacciones inmunoquímicas, después de formar una -
10 suspensión con estas tabletas.

Por la memoria descriptiva de la Patente EE:UU.
nº 3.096.250 se conocía ya la forma de sensibilizar los -
eritrocitos tratados previamente con formalina, en presen-
cia de una solución de formalina, haciéndolo a un pH den-
15 tro de 2 unidades desde el punto isoelectrico del antígeno
usado. Esto significa que cuando se aplica el antígeno
GCH, con un punto isoelectrico igual a 2,98, la sensibili-
zación ha de tener lugar a un pH menor que 5, a diferen-
cia del presente método, en el que solo se obtienen bue-
nos resultados a un pH mayor que 5,5. Aún otra diferencia
20 es que según el método conocido se aplica una concentra-
ción mayor de formalina, es decir, de 2 a 10 %, mientras
que el nuevo método utiliza una concentración menor de 2%,
y preferiblemente menor de 0,25 % (peso/volumen). Final-
mente, según dicha patente se requiere la presencia de --
25 formalina durante todo el período de sensibilización, a -
diferencia de la presente invención.

Se han efectuado ensayos comparativos con el --
presente método de tratamiento, con GCH como antígeno, a
30 diferentes pH, siendo las condiciones, por lo demás, com-

22.4.67



pletamente iguales a las descritas en el ejemplo 1 de la memoria descriptiva de dicha patente, y con ellos se ha puesto claramente en evidencia que el tratamiento a pH - iguales a 4,4 y 5,0 no conduce a eritrocitos utilizables para determinaciones inmunoquímicas.

5

Además, se ha hallado que se obtienen excelentes resultados con eritrocitos previamente tratados, sucesivamente, con formalina y tanino. Este método se presta particularmente bien para el uso de gonadotrofina coriónica humana (GCH) como antígeno. Se prefiere una concentración de GCH de 10 a 50 UI/ml. Cuando se utiliza GCH muy pura, la concentración se ha de elevar hasta aproximadamente 200 UI/ml. Durante la sensibilización con GCH, -- procedimiento que usualmente exige uno o unos pocos días, se deja que el formaldehído actúe sobre los eritrocitos - durante las últimas 12 a 24 horas, o así, pero preferiblemente durante las últimas 15 horas. La temperatura a la - que la acción es óptima está comprendida entre 30 y 40°C, pero se aplica preferiblemente una temperatura de 37°C.

10

15

20

Además, se ha hallado que cuando se usa GCH como antígeno el tratamiento según la invención produce - siempre muy buenos resultados a un pH de aproximadamente 6,4.

25

Finalmente, se ha hallado un procedimiento para fabricar tabletas, u otras formas sólidas de dosis unitaria, de eritrocitos adecuados para determinaciones inmunoquímicas, caracterizado porque los eritrocitos preparados según la invención se mezclan con los productos auxiliares requeridos para la formación de tabletas y la de-- terminación inmunoquímica, y luego se comprimen para obte

30



ner formas de dosis unitaria.

5 Se efectuaron numerosos ensayos con suspensiones de eritrocitos obtenidos después de la sensibilización, - en su mayor parte después de una a dos semanas de almace-
10 namiento, y además con los polvos obtenidos después de sé- car por congelación la suspensión, también después de una a dos semanas de almacenamiento, por ejemplo, y finalmen- te con las tabletas obtenidas a partir de estos polvos, que pesaban aproximadamente 15 mg, para establecer las -
15 condiciones óptimas para el presente tratamiento. Estos - ensayos se efectuaron de la siguiente forma:

Se hizo una serie de diferentes diluciones de - un antisuero adecuado, al que se añadió una cierta canti-
15 dad de una orina sin GCH. Se mezcló con esta mezcla la preparación de eritrocitos a ensayar. Luego se examinó si los eritrocitos se aglutinaban completamente a una dilu-
20 ción grande del antisuero. También se añadió la misma pre- paración de eritrocitos a mezclas de la misma dilución del antisuero y orina con GCH. Solo se consideró aceptable el
25 resultado si se podía mostrar en un corto tiempo, por ejem- plo en menos de 2 horas, la presencia de 1 UI de GCH por ml, es decir, cuando la aglutinación de los eritrocitos -
30 cargados con GCH con antisuero, a una dilución adecuada, fué completamente inhibida con orina que contenía 1 UI/ml.

Los eritrocitos tratados según la inyección se han hecho lo suficientemente fuertes para ser comprimidos formando, por ejemplo, tabletas. Para este fin se pueden aplicar los productos auxiliares usuales, que no han de -
35 ser agresivos para los eritrocitos y el antígeno unido a ellos. Es natural que la unión entre el antígeno y los -

22.4.67

- 6 -

338201



eritrocitos no haya de ser afectada de modo adverso por los productos auxiliares usados, y que estos no deban tener una influencia perceptible sobre las determinaciones a que se destinan los eritrocitos, de forma que no cambien esencialmente la sensibilidad, exactitud y velocidad de la reacción de determinación.

Se ha hallado además que los eritrocitos tratados según la invención no solo tienen propiedades mecánicas muy perfeccionadas, sino también mayor estabilidad a la aglutinación con antisuero. Así, la aglutinación total se podría obtener incluso con una suspensión de eritrocitos no tratada, sensibilizados con GCH a una dilución de antisuero igual a 1/2500, mientras que después del tratamiento según la invención de la misma suspensión produjo la misma reacción a una dilución de antisuero de 1/7500 a 1/15000.

La invención no se limita a la aplicación en la sensibilización de eritrocitos con GCH; también se puede aplicar a la sensibilización con cualquier antígeno que pueda resistir el presente tratamiento con formaldehído.

Para determinaciones inmunoquímicas se puede aplicar tanto el polvo de eritrocitos sensibilizados obtenido, por ejemplo, por secado por congelación, o por secado por pulverización de la suspensión, como las tabletas obtenidas de él por compresión.

Dado que los polvos obtenidos por secado por congelación de suspensiones de eritrocitos son muy higroscópicos, se mezclan y comprimen con los otros productos auxiliares preferiblemente en una atmósfera que tenga un grado de humedad relativa pequeña, preferiblemente de hasta apro



ximadamente 20%. Es ventajoso elegir en la compresión tales ingredientes, y aplicar tales condiciones, que el tiempo de desintegración de las tabletas sea corto, por ejemplo menor que 3 min.

5 Como ejemplos de productos auxiliares a aplicar se mencionan los siguientes, que preferiblemente se aplican en la preparación de tabletas para efectuar reacciones de embarazo. Como cargas se pueden usar, entre otras, la sacarosa, manita, lactosa y urea; como lubricantes, por ejemplo, ácido bórico, almidón, Carbowax 4000 y estearato de magnesio; como agentes de desintegración, por ejemplo, almidón y ácido algínico. Otros ingredientes son, por ejemplo, sustancias usadas en dicha determinación, tal como fosfatos, por ejemplo fosfato monopotásico y fosfato disódico, que sirven como tampones de la suspensión preparada con las tabletas, y también cloruro sódico y un agente de quelación, tal como la sal disódica del ácido etiléndiaminotetraacético (EDTA) y albúmina. Los ingredientes requeridos se pueden mezclar en estado seco con los eritrocitos tratados, antes de formar las tabletas, pero es más ventajoso disolver juntos los ingredientes solubles, y secarlos por secado, por pulverización, seguido por mezclado con los eritrocitos tratados, para obtener una mezcla muy homogénea y evitar que los eritrocitos sean dañados durante el tratamiento posterior, debido a los componentes cristalinos bastos de los productos auxiliares.

10

15

20

25

En el tratamiento de productos auxiliares insolubles se ha de prestar especial atención a que no interfieran con las determinaciones efectuadas con una suspensión obtenida a partir de las tabletas, ya que los compo-

30
22.4.67

338201



26

nentes insolubles serán fácilmente capaces de modificar el esquema de sedimentación de los eritrocitos, influyendo - así desfavorablemente sobre la exactitud de la observación.

5

Descripción de las realizaciones preferidas

En los ejemplos siguientes, que se han de considerar como ilustrativos, y no como limitativos, se hallarán más detalles del procedimiento.

Ejemplo 1

10

Una suspensión de eritrocitos de oveja, tratados de forma conocida con formalina y tanino, fué centrifugada y lavada con un tampón de fosfato y cloruro sódico, de pH igual a 6,4, y luego fué incorporada en este tampón. Se añadió a esta mezcla un volumen igual de una solución de 50 UI de GCH por ml, en un tampón de pH igual a 6,4. Esta mezcla fué almacenada durante 48 horas a 37° C, tras lo cual se añadió formaldehído hasta que se obtuvo una concentración final de 0,25% (peso/volumen) de formaldehído. -- Luego se almacenó esta mezcla durante 15 horas a una temperatura de 37° C, tras lo cual se volvieron a centrifugar los eritrocitos, se lavaron con una solución salina fisiológica, se incorporaron, como suspensión, el 10% v/v, en una solución salina fisiológica que contenía 0,1% de albúmina de suero bovino, y se almacenaron durante unos pocos días a de 0 a 4° C.

15

20

25

Después de ésto se centrifugaron los eritrocitos, se lavaron con una solución salina fisiológica, y se secaron por congelación, de forma conocida. El polvo es un buen reactivo de la GCH.

30

22.4.67

338201



Ejemplo 2

5 Se trataron 300 ml de la suspensión de eritrocitos de pH igual a 5,4, según el ejemplo 1, con 300 ml de una solución de GCH con 50 UI de GCH por ml, a pH igual a 7,6, y luego con formaldehído, a concentración final de 0,5%. Después de secar el polvo por congelación, se formaron tabletas. Las tabletas obtenidas dieron excelentes resultados como reactivo de ensayos inmunoquímicos de embarazo.

10

Ejemplo 3

Por el método del ejemplo 1, se sensibilizaron eritrocitos con GCH, en presencia de formaldehído, a concentración final de 0,25%, y élllo durante las últimas 24 horas a 30° C. Después de secar por congelación y de comprimir, se obtuvieron tabletas que dieron excelentes resultados como reactivo en un ensayo de GCH.

15

Ejemplo 4

20 Se efectuaron experimentos con tratamiento con formaldehído durante las últimas 15 horas de la sensibilización de eritrocitos con GCH, según el ejemplo 1, pero esta vez a un pH igual a 5,5. La suspensión se secó en un secador Niro por pulverización, con una temperatura de entrada de 125° C y una temperatura de salida de 75° C. Luego se mezcló el polvo resultante con 0,4% (peso/peso) de almidón de patata, y se comprimió formando tabletas de aproximadamente 15 mg. Dieron excelentes resultados como reactivo en determinaciones inmunoquímicas de embarazo.

25

22.4.67

- 10 -

338201

Esta solicitud que corresponde a la presentada en Holanda, el día 24 de Marzo de 1.966, con el número - 66-03.909, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

- N O T A -

5 Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

10 1.- Un procedimiento para la preparación de eritrocitos apropiados para la determinación inmunológica de antígenos, por tratamiento de los eritrocitos con uno o más agentes curtientes, seguido por sensibilización con el antígeno, caracterizado porque la última etapa de la sensibilización se efectúa en presencia de formaldehído, a concentración menor que 2% (peso/volumen), a pH de 5,5 a 8.

15 2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se usan como material de partida eritrocitos que han sido tratados sucesivamente con formaldehído y tanino.

20 3.- Un procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque se usa como antígeno gonadotropina coriónica humana.

25 4.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la sensibilización se efectúa en una solución de formaldehído con concentración de apro-

22.4.67

338201



ximadamente 0,25% (peso/volumen).

5.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el tratamiento se efectúa a aproximadamente 37° C.

5 6.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el tratamiento se efectúa durante aproximadamente las últimas 15 horas de sensibilización.

10 7.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el tratamiento se efectúa a un pH de aproximadamente 6,4.

15 8.- Un procedimiento para fabricar tabletas, u otras formas sólidas de dosis unitaria, a partir de eritrocitos adecuados para determinaciones inmunoquímicas, caracterizado porque los eritrocitos tratados según uno o más de los métodos según las reivindicaciones 1 a 7 son mezclados con los productos auxiliares requeridos para la formación de tabletas y para el método de determinación, y luego son comprimidos para obtener formas de dosis unitaria.

20

9.-Un procedimiento para la preparación de eritrocitos apropiados para la determinación inmunoquímica de antígenos.

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

338201

22.4.67

26



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

Madrid,

26 ABR 1967

P. A.

Alberto de Alarcón
Alberto de Alarcón
Por orden

338201