

9-5-73



377480

SECCION	TR
CLASIFICACION	
CLASE	A 61
SUBCLASE	B

PATENTE DE INVENCION  
 POR VEINTE AÑOS  
 EN ESPAÑA

A favor de Dr. Thomas Tallberg, de nacionalidad finlandesa,  
 con domicilio en HELSINKI 20 (Finlandia) Kataja-harjuntie,  
 16 A,

por

" PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UN PREPARADO POR MEDIO  
 DEL CUAL PUEDEN DETECTARSE CANTIDADES FISIOLÓGICAS DE UN  
 ANTIGENO "

~~~~~

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención comprende una composición  
 basada en partículas polimer protein-anticuerpo-activas en  
 la que pueden detectarse cantidades fisiológicas de un an-  
 tígeno en una solución y una descripción de como puede pro-  
 ducirse dicho preparado.

5

Pruebas inmunológicas, son usadas bastante ex-  
 tensamente, para efectos de diagnóstico, en la moderna -

POOR  
QUALITY

377480



- 2 -

práctica médica. Usando metodos inmunologicos, se pueden -  
medir, por ejemplo, cantidades fisiologicas de diferentes  
substancias antigenicas, tales como hormonas, encimas y di-  
ferentes proteinas de los sueros o de los tejidos. Estos -  
5 metodos estan basados en el uso de particulas portantes a  
las cuales han sido adheridos diferentes antigenos o tam-  
bien anticuerpos. De esta manera, se obtienen particulas -  
indicadoras sensitizadas, que pueden ser utilizadas en di-  
ferentes reacciones inmunológicas. Por ejemplo, podriamos  
10 mencionar tests inmunológicos mediante los cuales un esta-  
do de preñez puede ser demostrado en sus primeras fases. -  
Estos tests estan basados en el hecho de que la hormona an-  
tigenica " human chorionic gonadotrophine " (HCG), que es  
producida por la placenta durante la primera fase de la --  
15 preñez, ha sido absorbida o conjugada quimicamente a parti-  
culas portantes, consistentes en celulas sanguineas rojas,  
especialmente tratadas o particulas latex. Cuando un anti-  
suero es añadido a HCG, estas particulas indicadoras, sensi-  
bilizadas, son aglutinadas. Pero, si una gota de orina de  
20 una mujer preñada, que contiene HCG, es mezclada con una -  
gota de suero anti-HCG, en dilución correcta y la mezcla  
se deja reaccionar durante un cierto tiempo, cuando las -  
particulas indicadoras son añadidas entonces a la suspen-  
sión, la aglutinación es inhibida. Un teste correspondien-  
25 te, realizado con la orina de una mujer no preñada, no --  
afecta la concentracion anti-HCG lo que explica por que -  
en este caso la aglutinación no es inhibida.

En lugar de antigenos, ha sido posible ligar an-  
ticuerpos especificos a particular portantes, especial- -  
30 mente preparadas y tales immunoabsorbentes anticuerpo-ac-  
tivos, han sido usados, por ejemplo, para medir el nivel  
de insulina en el suero de personas normales y diabeticas.

En estos metodos inmunológicos previamente co-

10-50-73

377480



5

10

15

20

25

30

nocidos y clínicamente utilizados se han usado siempre par-  
 ticulas portantes, a las cuales, o sobre las cuales, han -  
 sido adheridos diferentes antigenos o anticuerpos, absorbi-  
 dos o químicamente conjugados. La presente invención está  
 basada en el uso de particulas polimer-proteinas-anticuer-  
 po-activas insolubles en agua, hechas de antisueros especi-  
 ficos. Tales particulas polimero proteinas pueden ser pro-  
 ducidas usando por ejemplo, la técnica presentada en J.Biol.  
 Chem. 1967, 242,1651-, en la que la polimerización fue rea-  
 lizada usando etil-cloroformiato o como se describe en - -  
 " Immunochemistry, 1969, 6, 53-, usando gluteraldeido como  
 agente polimerizante. Se obtienen así pastas polimericas --  
 que retienen una cierta cantidad de la actividad anticuer-  
 po especifica. Estas pastas polimericas, son despues, nue-  
 vamente tratadas, usando homogeneización mecanica y ultra-  
 sonica, en una forma que ha sido descrita anteriormente por  
 mi, Ann. Med.exp.Biol.Fenn.1967,45,477-,

De esta forma, se obtienen particulas polimero-  
 proteinas anticuerpo-activas, extremadamente pequeñas, de  
 un tipo que se representa esquematicamente en el dibujo de  
 la fig. 1, en que el antigeno " human placental lactogen "  
 u hormona, ha sido usado como ejemplo. Estas particulas son  
 aproximadamente, del mismo tamaño o menores que las bacte-  
 rias pequeñas, y pueden ser claramente vistas con el mi-  
 croscopio electronico. Una gota de esta suspensión immuno-  
 logica de particulas especificas, colocada sobre una placa  
 de vidrio, aparece como una suspensión opalescente homogé-  
 nea. Esta suspensión homogeneizada es estable. La adición  
 de una solución amortiguadora, fisiologica, no origina una  
 precipitación o una aglutinación no especifica, incluso si+  
 la solución contiene diferentes proteinas extrañas o subs-  
 tancias heterogeneas antigenicas. Pero si, una cantidad -  
 equivalente del antigeno homologo, es añadida en una solu



ción estabilizadora, fisiológica, a las partículas en sus-  
pensión, aparece una reacción aglutinante, tal como yo he  
demostrado en el estudio arriba mencionado. Con ciertos -  
antígenos llamados débiles, esta reacción aglutinación vi-  
sible, no es demostrable. Como ejemplos de tales antige-  
nos se podría mencionar el placentar lactogen humano - -  
(HPL) " gonodotropin corionico humano " (HCG) y la insuli-  
na.

Sin embargo, yo he descubierto que a pesar de -  
esta falta de aglutinación reacción clara, las partículas  
anticuerpo activas, han tomado específicamente su antige-  
no homologo de reacción cruzada, y por consiguiente, se -  
han hecho inmunologicamente revestidas por el antígeno, -  
El principio de una partícula tal, inmunologicamente reves-  
tida, se muestra en la fig. 2. Una incubación comparativa-  
mente larga, o sea de 1-3 días es favorable, ya que el -  
antígeno tiene tiempo, entonces, de unirse mas efectiva-  
mente a los puntos ligantes anticuerpo-activos. Para con-  
seguir este revestimiento óptimo, se usan favorablemente,  
cantidades inmunologicamente equivalentes o quizas canti-  
dades ligeramente menores del antígeno. Solamente muy pe-  
queñas cantidades de antígeno, son necesarias para conse-  
guir un revestimiento completo y la preparación antígeno -  
no tiene que ser completamente pura. La incubación tiene  
lugar en una solución fisiológica y el resultado puede --  
ser mejorado por la presencia de una pequeña cantidad de  
un detergente, es decir, un detergente de nombre comer-  
cial "Tween 20" (un polioxidalcile-nederivado-sorbitan-  
monolaurat) en concentración de un 0,2%.

Después de la incubación, las partículas son -  
lavadas 1 - 3 veces con una solución de fosfato fisiológi-  
co y son entonces vueltas a suspender. Las partículas ob-  
tenidas de esta manera reaccionan inmunologicamente, de--



5 bido al hecho de que las moléculas antígenos, que se pegan a la partícula, pueden reaccionar aún con anticuerpos homólogos o de reacción cruzada, si estos son añadidos en diluciones óptimas. Como resultado de esto, las partículas pueden ser usadas como partículas indicadoras, directamente - para demostrar anticuerpos específicos, o usando la llamada técnica de inhibición aglutinación, también para demostrar antígenos específicos.

10 Las partículas indicador tienen una tendencia -- a no mostrar claramente visible aglutinación alguna, si el antisuero aglutinante, es usado en una forma demasiado concentrada. Con partículas polímeros inmunológicamente revestidas, este falsamente negativo o también llamado "fenómeno-prozona", puede alcanzar a diluciones de 1:160 del antisuero, mientras que las concentraciones realmente aglutinantes del mismo suero, pueden aparecer entre 1:320 - 1:1600.

15 Este fenómeno-prozona se utiliza en la presente invención para obtener un reactivo, que hace posible demostrar y también medir cantidades fisiológicas y pequeñas de un antígeno, utilizando una simple suspensión reactiva.

20 Para conseguir esto, hay que realizar series de tests con las partículas polímeros inmunológicamente revestidas, contra el antisuero homólogo, en series de doble dilución, esto es 1:20 - 1:320, para determinar la región prozona para la reacción antígeno-anticuerpo. Basándose - en estos tests se añade a la suspensión polimérica el antisuero, en una concentración conveniente, por ejemplo - -- 1:20 - 1:40 y se obtiene de esta forma una suspensión homogéneo-reactiva "falso-negativa". Esta contiene pequeñas partículas poliméricas, conteniendo un núcleo de polímeros proteino-anticuerpo-activos, rodeados por antígenos inmunológicamente adherentes a las partículas anticuerpo-

377480



5 activas. Por encima de esto, los otros determinantes anti-  
genos de las moléculas antígenos, aun libres para reaccio-  
nar, son saturados por una capa exterior de moléculas an-  
ticuerpo efectivas. Este llamado estructura de relleno es  
tá representado, en principio, en la fig. 3,

10 Si una gota de esta suspensión reactiva, es aña-  
dida a una solución que contenga incluso muy pequeñas can-  
tidades del antígeno correspondiente, una mutación de la  
concentración tendrá lugar más allá de la "fase-prozona" y  
como resultado de ello, una clara aglutinación será dis-  
cernible. Un ejemplo de la utilidad de este método, puede  
demostrarse con el lactogen-protein-hormona humano placen-  
tal (HPL), que aparece en el suero, en la orina y en la -  
saliva de una mujer embarazada, despues del primer trimes-  
15 tre. La preparación puede usarse para demostrar el HPL -  
cuantitativamente y cualitativamente. Esto es debido al -  
hecho de que el suero de una mujer preñada dará un efecto  
aglutinante, en tanto que una cantidad similar de un sue-  
ro humano normal de una mujer no-embarazada, no es capaz  
20 de mutar el complejo reactivo a la fase de aglutinación -  
y por consiguiente el teste es negativo, esto es que el -  
HPL no esta presente en la circulación.

25 El preparado de acuerdo con la invención, es --  
tan sencillo que no requiere personal calificado para --  
efectuarla. Puede ser realizado por la paciente misma. --  
Suspensiones polimeras inmunologicamente revestidas, pre-  
paradas contra el HCG-hormona, pueden ser usadas para de-  
mostrar la presencia de dicha hormona, en la orina de la  
paciente, en un temprano periodo de preñez. La presencia  
30 de dicha hormona en la circulación, debida a tumores que  
producen hormonas, pueden tambien ser demostrada. "Fetuin  
proteina del suero humano, Suero de Yegua Preñada" (FMS)  
que aparece en las yeguas preñadas, y además, por ejemplo



insulina, son adecuados para la preparación de una suspensión reactiva, de acuerdo con la invención. Cuando se hace para insulina, hay que usar un antígeno etiquetado, el más conveniente de los cuales es el etiquetado radio-activamente. La reacción es medida utilizando un contador centelleador, como razón entre antígeno libre y radioactivo, ligado a las partículas.

Preparados de acuerdo con la invención, son también empleadas como indicadores, cuando son purificadas substancias antigenicas.

Ejemplo

Cantidades de  $\frac{1}{2}$  ml. de anti-HPL partículas polímeras activas, son incubadas durante tres días con iguales volúmenes de diferentes diluciones de la hormona antígeno (HPL) alrededor del punto equivalente. Las partículas inmunológicamente revestidas son lavadas por centrifugación en solución de fosfato pH 7.2 y redispersadas mediante agitación vigorosa. La aglutinabilidad de la suspensión de partículas es probada empíricamente durante el proceso de lavado. El lote que exhibe buena aglutinabilidad al añadirle concentraciones óptimas antisueros pero que también da una larga región-prozona, es decir con diluciones del suero anti-hormona de hasta 1:150 es elegido para ser usado como índice reactivo del tests.

A este lote de partículas revestidas, se añade una cantidad igual del suero anti-hormona, por ejemplo diluido a 1:40 de fosfato amortiguado salino, que contengan un agente bactericida. Esta suspensión de partículas no se aglutinará, debido al exceso de anticuerpo. Esta suspensión polímera homogénea "falso" negativa, es estable. Pero si una gota de ella es añadida a una gota de suero humano que contenga pequeñas cantidades de HPL, la suspensión polímera es empujada fuera de la fase-prozona y se aglutina.-

377480



- 8 -

Una gota de suero procedente de una mujer no preñada, no causa esta mutación.

5 Estimaciones cuantitativas pueden hacerse, si se usan diferentes diluciones de la muestra a comprobar. Es to puede también hacerse usando diferentes diluciones - del antisuero, dentro de la región prozona (1:1 - 1:80).

NOTA REIVINDICATORIA

En esta Patente de Invención se reivindica:

10 1.- Procedimiento para la obtención de un preparado por medio del cual pueden detectarse cantidades fisiológicas de un antígeno, caracterizado por comprender la polimerización de un antisuero contra el antígeno deseado, en polímero-proteína insoluble al agua, la homogeneización de dicho polímero proteína en una suspensión finamente dispersada de partículas polímeras anticuerpo-  
15 activas, revestimiento de dichas partículas con una cantidad equivalente, substancial e inmunológicamente de un antígeno seleccionado del grupo consistente de antígenos específicos y antígenos de reacción cruzada, lavado y sus  
20 pensión de dichas partículas, y adición a la suspensión obtenida de un antisuero, que reaccione con dicho antígeno, en una concentración seleccionada, para dar un efecto prozona, el cual permanecerá, si la solución es mezclada con una muestra standard carente del antígeno apropiado, pero que producirá una aglutinación claramente fegis-  
25 trable si se mezcla con una muestra standard que contenga una cantidad fisiológica de dicho antígeno.

2.- Procedimiento para la obtención de un preparado por medio del cual pueden detectarse cantidades fi-

10-5-73

377480



- 9 -

5

siológicas de un antígeno, como en la reivindicación 1, en el que el revestimiento de las partículas polímeras anticuerpo-activas, con el antígeno, es llevado a cabo en presencia de una pequeña cantidad de un agente superficial activo.

10

3.- " PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UN PREPARADO POR MEDIO DEL CUAL PUEDEN DETECTARSE CANTIDADES FISIOLOGICAS DE UN ANTIGENO ", de conformidad en un todo en lo esencial y fines industriales a lo descrito en la precedente memoria descriptiva.

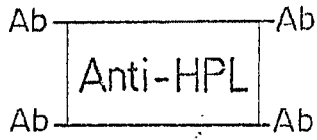
Esta memoria consta de NUEVE hojas escritas ó mecanografiadas por una sola cara a doble espacio.

Madrid, 7 AGO. 1972

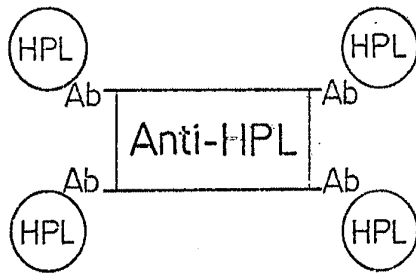
Por autorización del interesado.



*Fig. 1*



*Fig. 2*



*Fig. 3*

