

405361

22 A



P.- 51.649

HOE 71/B 007

Int. Cl.²: G01N

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION por VEINTE años

a nombre de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT

entidad alemana

establecida en Marburg/Lahn, República Federal Alemana

por: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE COMPUESTOS DE
LATEX DE POLIESTIRENO Y PROTEINAS O PEPTIDOS

(Clase Internacional G01n)

17.8.72

- 1 -

405361

22



Objeto del invento son nuevos compuestos de látex de poliestireno y proteínas o péptidos, que encuentran utilización como agentes de diagnóstico, así como un procedimiento para la preparación de dichos compuestos.

5 Los agentes de diagnósticos conocidos a base de poliestireno y proteínas consisten en una suspensión acuosa de partículas de poliestireno que contiene eventualmente un sistema tampón, en el cual las proteínas o péptidos están fijados por adsorción. Cuando una proteína o péptido
10 adsorbido de este modo reacciona con el anticuerpo que le corresponde, el poliestireno precipita en forma de pequeños copos. La reacción positiva entre antígeno y anticuerpo puede ser hecha visible de este modo.

15 Los agentes de diagnóstico obtenidos por adsorción de una proteína en latex de poliestireno tienen no obstante la desventaja de que su estabilidad es limitada, dado que la adsorción es reversible y por consiguiente se llega con frecuencia a una desorción.

20 Con algunas proteínas, hasta el momento no se ha hecho posible de ningún modo fijarlas por adsorción a látex de poliestireno. Por lo tanto, con tales proteínas no era posible la obtención de agentes de diagnóstico mediante látex de poliestireno.

25 Los compuestos de acuerdo con el invento a base de látex de poliestireno y proteínas o péptidos están ca-

405361 22



racterizados porque en ellos una proteína o un péptido es
tá fijado con ayuda de un compuesto de diazonio aromático
en un homopolímero o copolímero del estireno.

5 El procedimiento del invento está caracterizado
por consiguiente porque se hacen reaccionar entre sí (1)
una suspensión de látex de poliestireno, (2) una protefi-
na o un péptido, y (3) un compuesto de diazonio aromático.

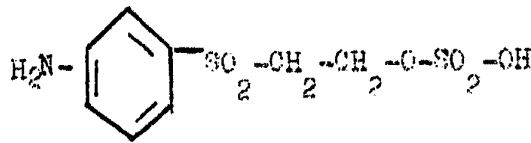
10 Por medio del procedimiento de acuerdo con el
invento se pueden fijar a látex de poliestireno proteínas
o péptidos con efecto inmunológico que se pueden obtener
del comercio o que se pueden preparar de manera conocida,
por ejemplo proteínas de plasma, tales como albúmina, al-
fa-globulina, beta-globulina, gamma-globulina, trombina,
plasmina; proteohormonas tales como el péptido insulina
15 y la proteína coriogonadotropina; proteínas de virus, ta-
les como virus del sarampión; de bacterias tales como la
alfa-hemolisina de estafilococos; de protozoos tales como
Trypanosoma cruzi y Entamoeba histolytica; de helmintos,
tales como Schistosoma mansoni.

20 En calidad de compuestos de diazonio aromáticos
son apropiadas en el sentido del invento aminas aromáticas
diazotadas, preferiblemente las que contienen uno o varios
grupos funcionales adicionales tales como grupos de ácido
sulfónico o grupos diazo. Como ejemplos de compuestos de
25 diazonio apropiados pueden citarse: los productos de dia-

405361



zotación de anilina, anilinas sustituidas, tales como
 2,5-dicloro-4-nitro-anilina, feniléndiamina, benzidina,
 dianisidina, diamino-difenilmetano, diamino-difenilsulfo
 5 fon-etoxi sulfónico de la fórmula



15 En calidad de látices de poliestireno son apropiados no solamente los basados en homopolímeros del estireno, sino también copolímeros que contienen más de la mitad de su peso molecular de unidades de monómero de estireno, a saber copolímeros del estireno con ácido acrílico o ácido metacrílico.

20 Igual que en los conocidos reactivos de látex de poliestireno preparado por adsorción, también a los preparados obtenidos de acuerdo con el invento pueden añadirse estabilizadores de suspensión, por ejemplo glicerina y/o albúmina de suero. Además de ello, los preparados pueden ser agitados, removidos o tratados con ultrasonidos,
 25

40536122



con el fin de obtener una suspensión homogénea.

En el procedimiento de acuerdo con el invento se procede convenientemente diluyendo primero una suspensión de látex de poliestireno a un contenido de sustancia
5 sólida de aproximadamente 5-15 % en peso, preferiblemente a 10 % en peso. Para ello se añade la proteína o el péptido convenientemente disuelto en una solución tampón. La adición de un estabilizador, por ejemplo glicerina, en cantidades de aproximadamente 2 % en volumen, se ha mani-
10 festado conveniente en muchos casos. A esta mezcla, o bien se agrega la solución de sal de diazonio preparada en un recipiente separado o bien se introduce como tal el compuesto amínico que sirve como sustancia de partida para esta preparación y se le diazota de manera conocida
15 en presencia de los restantes participantes en la reacción.

En algunos casos, especialmente en el caso de utilización de ácido para-amino-fenilsulfonetoxisulfónico, este compuesto puede ser añadido también en forma de sustancia sólida a la suspensión de látex de poliestireno.
20 En este caso se aconseja agitar la suspensión durante 10 a 20 horas, preferiblemente 15 horas, a 30 - 80° C, preferiblemente a 40° C, y eliminar antes del tratamiento ulterior el ácido para-amino-fenilsulfonetoxisulfónico en exceso. Después de esto el grupo amino es diazotado de ma-
25 nera conocida.

4053612



El final de la diazotación, que normalmente está terminada después de 15 minutos, puede ser comprobado de manera conocida por ejemplo con beta-naftol en solución diluida de NaOH.

5 En este caso las partículas de látex de poliestireno se colorean en un tono entre rosa y rojo.

10. Si esta reacción se desarrolla de modo positivo, el péptido o proteína activo inmunológicamente es añadido, con enfriamiento, por ejemplo a 2 - 8° C, preferiblemente a 4° C., en solución alcalina, por ejemplo a pH 7,5 - 9,5, preferiblemente a pH 8,5, al producto de copulación de poliestireno. Para el ajuste del valor de pH débilmente alcalino son apropiadas especialmente mezclas tampón que contienen ácido bórico.

15 Después de aproximadamente 2 horas se puede agregar un estabilizador, preferiblemente una solución al 20% de albúmina de suero humano, y el producto puede ser homogeneizado por tratamiento con ultrasonidos. Si el preparado producido de acuerdo con el invento debe ser diluido
20 al mismo tiempo a una determinada concentración, se utiliza para ello convenientemente una solución al 1% de albúmina de suero humano.

25 La fijación irreversible de la proteína o péptido a las partículas de poliestireno en los reactivos de acuerdo con el invento puede comprobarse por medio del si

405361

22



guiente ensayo:

ENSAYO

5 Para la comprobación de la fijación irreversible se tratan muestras de los compuestos de acuerdo con el invento con solución 1 molar de sal común a pH 5,0 y a pH 8,0, con urea 5 molar a pH 8,0, y con una solución acuosa al 5% de dimetilsulfóxido. Se utilizó dimetilsulfóxido, dado que como compuesto polar aumenta la solubilidad de las proteínas, y de la urea se sabe que rompe o
10 desdobra puentes de hidrógeno.

2 ml. de una suspensión al 40 % de látex de poli-
estireno usual en el comercio (véase Ejemplo 1) son diluidos con 5 ml. de tampón de borato 0,2 molar de pH 8,5, que contiene 2 % en volumen de glicerina en calidad de es-
15 tabilizador. Luego se añaden 40 mg. de gamma-globulina de conejo que tiene especificidad de anticuerpo frente a antígeno de Australia y está disuelto en 1 ml. de tampón de borato 0,2 molar de pH 8,5. La suspensión es enfriada con agitación a + 4°C. A continuación se agregan 0,08 ml. de
20 una solución al 0,2 % de benzidina bisdiazotada (para su preparación véase Ejemplo 2). Después de una hora la mezcla de reacción es diluida a 30 ml. con tampón de borato 0,2 molar de pH 8,5.

Luego la mezcla de reacción es dividida en cuatro volúmenes iguales de 7,5 ml.. Las cuatro porciones son
25

405361

22



centrifugadas durante una hora a 40.000 veces la fuerza de la gravedad.

5 En las partes sobrenadantes ya no se puede com
probar nada de proteina por precipitación con 1,0 ml. de
ácido tricloroacético al 50 % sobre 5 ml. de parte sobre-
nadante. A título comparativo se hizo reaccionar a + 4° C.
una solución de 6,67 mg. de la gamma-globulina de conejo
utilizada con 0,013 ml. de benzidina bisdiazotada al 0,2%
10 en 5 ml. de tampón de borato 0,2 molar de pH 8,5 y se mez
cló con 1,0 ml. de ácido tricloroacético al 50%. El preci
pitado fue centrifugado, fue disuelto en 5 ml. de hidróxi
do de sodio 0,1 molar y de este modo se realizó un análi
sis de nitrógeno. En la muestra comparativa se determina
ron 0,2 mg. de nitrógeno/ml., mientras que en las partes
15 sobrenadantes de las cuatro porciones no resultó nada de
precipitado con ácido tricloroacético y no se detectó na
da de nitrógeno.

Los sedimentos de las cuatro porciones fueron
vuelto a suspender dos veces cada vez con 5 ml. de las
20 soluciones que se dan a continuación y fueron centrifuga
dos dos veces a 40.000 veces la fuerza de la gravedad du
rante una hora.

- 1) 5% en volumen de dimetilsulfóxido en agua.
- 2) 5 moles/litro de urea en agua.
- 25 3) 1 mol/litro de cloruro de sodio en tampón de borato 0,2

405361 22



molar de pH 8,5.

- 4) 1 mol/litro de cloruro de sodio en tampón de acetato de sodio 0,2 molar de pH 5,0.

5 De los cuatro sedimentos se obtuvieron por medio del tratamiento descrito, en cada uno de los casos 2 partes sobrenadantes, es decir en total se obtuvieron 8 partes sobrenadantes, las cuales fueron dializadas frente a tampón de borato 0,2 molar de pH 8,5 y luego fueron concentradas a un volumen de 5 ml. con un aparato de funda o cartucho de colodión (Firma Sartorius Membranfiltergesellschaft, Göttingen). En todas las 8 partes sobrenadantes no se obtuvo ningún precipitado con 1 ml. de ácido tricloroacético al 50 %. Por consiguiente no se desorbió nada de proteína desde el látex de poliestireno.

15 Después de la segunda centrifugación los residuos fueron vueltos a suspender en cada caso con una solución al 1,5 % de albúmina humana en tampón de borato 0,2 molar de pH 8,5 y fueron homogeneizados por tratamiento con ultrasonidos durante 30 segundos con 20 kilohertzios y 125 watios.

20 Las cuatro suspensiones reaccionan con sueros, que contienen antígeno de Australia, con formación de una aglutinación.

25 Las investigaciones muestran que incluso a pesar de rigurosas condiciones no se desdobló ni separó de las



partículas de látex de poliestireno nada de material inmunológicamente activo y que su actividad durante este tratamiento permaneció conservada en toda su extensión.

5 La preparación de diferentes reactivos correspondientes al invento está mostrada por los siguientes Ejemplos, los cuales sin embargo no deben limitar el objeto del invento:

Ejemplo 1

10 10 ml. de una suspensión al 40 % de látex de poliestireno usual en el comercio (Polystyrene-Latex de la firma The British Drug Houses Ltd.) son diluidos con agitación con 40 ml. de solución 0,2 molar de hidróxido de sodio. A esta suspensión se añaden 200 mg. de ácido para-aminofenilsulfonetoxisulfónico. La mezcla es agitada a 40° C. durante 3 horas y a continuación es dializada
15 durante 15 horas a 20° C. frente a agua destilada. Después de la diálisis se enfría la suspensión a 4° C. y, con agitación, se mezcla con 15 ml. de ácido clorhídrico 0,15 molar y 4 ml. de una solución 0,2 molar de nitrito de sodio.

20 Si se desarrolla positivamente la reacción con beta-naftol, el péptido o la proteína inmunológicamente activo que se ha de fijar al látex de poliestireno, disuelto en 100 ml. de una solución tampón de ácido bórico-borax 0,2 molar, denominado en los ejemplos que siguen tampón
25 de borato, con un valor de pH 8,5, se añade enfriado a

405361

22



4^o C, al producto de copulación. Con los siguientes péptidos y proteínas inmunológicamente activos se realizó el procedimiento según el invento de acuerdo con el Ejemplo 1:

- 5 a) 50 mg. de coriogonadotropina humana (CGH), 3.220 U/mg.
b) 50 mg. de insulina de zinc de vacuno cristalizada.
c) 50 mg. de insulina de zinc de porcino cristalizada.
d) 200 mg. de anti-inmunoglobulina M IgM de conejo
e) 200 mg. de gamma-globulina anti-antígeno de Australia
10 de conejo.

15 Dos horas después de la adición de la solución del péptido o de la proteína inmunológicamente activo se añaden, a las cargas con coriogonadotropina humana y a las cargas con insulina de zinc de vacuno y de porcino (a, b y c), 7,5 ml. de una solución acuosa al 20% de albúmina de suero humano, y a las cargas con las dos gamma-globulinas (d y e) se añaden 15 ml. de una solución al 20 % de albúmina de suero humano. Cada una de las cinco cargas descri-
20 tas es diluida a 300 ml. con tampón de borato 0,2 molar de pH 8,5 y es homogeneizada con ultrasonidos de una frecuencia de 20 kilohercios según el procedimiento de circulación. Con una potencia de ultrasonidos de 750 waticos se pueden homogeneizar en 15 minutos las cargas de 300 ml. descritas.

25



Ejemplo 1a

10 ml. de la suspensión al 40 % de látex de poli-
liestireno que ha sido caracterizada con más detalle en el
Ejemplo 1 son diluidos, con agitación con una solución de
5 50 mg. de lactato de 7-etoxi-3,9-diaminoacridina en 30 ml.
de agua. Después de agitar durante una hora se añaden 10
ml. de ácido sulfúrico 1 normal. Luego la mezcla es enfria-
da a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ y es mezclada con 5 ml. de nitrito de sodio 0,2
molar. Después de continuar la agitación a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ durante
10 0,5 horas la suspensión diazotada es incorporada con agi-
tación en 200 ml. de una solución previamente enfriada a
 $\pm 4^{\circ}\text{C}$. de solución al 0,1 % de gamma-globulina anti-anti-
geno de Australia de conejo en tampón de borato de sodio
0,2 molar de pH 8,5, siendo mantenido en 8,5 el valor del
15 pH durante la adición de la suspensión ácida por medio de
adición gota a gota de solución 0,5 normal de hidróxido
de sodio. El baño de enfriamiento es retirado después de
5 a 6 horas. Después de agitar durante 15 horas más a 20°C
se añaden 15 ml. de solución al 20 % de albúmina de sue-
20 ro humano y se diluye a 300 ml. con tampón de borato 0,2
molar de pH 8,5. Se trata con ultrasonidos igual a como
se describe en el Ejemplo 1.

Ejemplo 2

10 ml. de la suspensión al 40 % de látex de poli-
liestireno que ha sido caracterizada con más detalle en el
25

405361

22



- Ejemplo 1 son diluidos a 60 ml. con tampón de borato 0,2 molar, de pH 8,5, que contiene 2 % en volumen de glicerina en calidad de estabilizador. A esta suspensión se añade la solución que contiene el péptido o la proteína inmunológicamente activo. La mezcla es enfriada a $\pm 4^{\circ} \text{C}$, es mezclada con 0,4 ml. de una solución acuosa de 0,2 % en peso de benzidina bisdiazotada, que se había obtenido a partir de benzidina por tratamiento con nitrito de sodio en ácido clorhídrico 0,2 molar a 4°C , y se agita durante una hora a 4°C . Después de esto se diluye a 300 ml. con una solución al 1 % de albúmina de suero humano en tampón de borato de pH 8,5. Con los siguientes péptidos y proteínas inmunológicamente activos se realizó el procedimiento según el invento de acuerdo con el Ejemplo 2:
- a) 10 ml. de una solución al 2% de gamma-globulina anti-antígeno de Australia de conejo.
 - b) 100 mg. de insulina de zinc de porcino, disueltos en 60 ml. de tampón de borato 0,2 molar de pH 8,5;
 - c) 100 mg de insulina de zinc de vacuno, disueltos en 60 ml. de tampón de borato 0,2 molar de pH 8,5
 - d) 10 ml. de una solución al 2% de gamma-globulina anti-IgE de conejo.
 - e) 10 ml. de una solución al 2% de gamma-globulina anti-IgA de conejo.
 - f) 10 ml. de una solución al 2% de gamma-globulina anti-

405361

22



alfa₁-fetoproteína de conejo.

- g) 10 ml. de una solución al 2% de gamma-globulina anti-proteína de embarazo₁ (PE₁) de conejo.
- h) 10 ml. de una solución al 2% de gamma-globulina anti-lactógeno de placenta humana (LPH) de conejo.
- 5 i) 10 ml. de una solución al 2% de gamma-globulina anti-fibrinógeno-Split D de conejo.
- j) 10 ml. de una solución al 2% de gamma-globulina anti-fibrinógeno-Split E de conejo.
- 10 k) 10 ml. de una solución al 2% de gamma-globulina anti-mioglobina de conejo.
- l) 10 ml. de una solución al 2% de gamma-globulina anti-haptoglobina de conejo.
- m) 10 ml. de una solución al 2% de gamma-globulina anti-proteína C reactiva (PCR) de conejo.
- 15 n) 10 ml. de una solución al 2% de gamma-globulina anti-alfa₁-antitripsina de conejo.
- o) 10 ml. de una solución al 2% de gamma-globulina anti-transaminasa de conejo.
- 20 De manera análoga se obtienen los correspondientes compuestos a base de gamma-globulina anti-antígeno de Australia (2a) y de insulina de zinc de porcino (2b) y látex de poliestireno con utilización de los siguientes componentes de copulación.
- 25 I. 0,4 ml. de dianisidina bisdiazotada al 0,2 %

17.8.72

405361



- II 0,4 ml. de 4,4'-diaminodifenilsulfona bisdiazotada al
0,25 %
- III 0,4 ml. de ácido 4-aminofenilsulfonetoxisulfónico dia-
zotado al 0,60%
- 5 IV 0,8 ml. de 2,5-dicloro-4-nitroanilina diazotada al
0,4 % disueltos en 10 ml. de ácido clorhídrico etanó-
lico 0,5 molar.
- V 0,8 ml. de anilina diazotada al 0,2 %
- VI 0,6 ml. de 2-naftilamina diazotada al 0,2 %
- 10 VII 0,6 ml. de 7-etoxi-3,9-diaminoacridina bisdiazotada al
0,3 % en ácido sulfúrico acuoso 0,15 normal.

Ejemplo 3

10 ml. de la suspensión al 40 % de látex de polies-
tireno que ha sido caracterizada con más detalle en el Ejem-
plo 1 son diluidos a 60 ml. con tampón de borato 0,2 mo-
lar que contiene 2% en volumen de glicerina en calidad de
estabilizador. A esta suspensión se añaden las cantidades
abajo indicadas de péptidos o proteínas inmunológicamente
activos, disueltas en cada caso en 60 ml. de tampón de bo-
rato 0,2 molar de pH 8,5. La suspensión es enfriada a 4°C
con agitación. Luego se añaden a la mezcla 0,8 ml. de una
solución de 2 mg. de benzidina bisdiazotada (preparada de
acuerdo con el Ejemplo 2) por ml. de solución. Después de
agitar durante una hora se añaden gota a gota 7,5 ml de
25 una solución al 20 % de albúmina humana y la suspensión

es diluída a 300 ml. con tampón de borato 0,2 molar de pH 8,5.

Con los siguientes péptidos y proteínas inmunológicamente activos se llevó a cabo el procedimiento según el invento de acuerdo con el Ejemplo 3:

5

a) 50 mg. de coriogonadotropina humana (CGH) con una actividad de 3220 U/mg

b) 100 mg. de proteína de virus de sarampión designada como hemaglutinina.

10

c) 100 mg. de alfa-hemolisina de estafilococos.

Ejemplo 4

3,5 g. de tripanosomas liofilizados de la especie *Trypanosoma cruzi*, cepa Brasil, del agente patógeno de la enfermedad de Chagas, son suspendidos en 100 ml. de benceno con el fin de extraer lípidos (Mackelt Z. Tropenmed. u. Parasit. 11, 152, 1960). Después de centrifugar durante media hora a 2.000 r.p.m. se decanta y se desecha la parte sobrenadante. El residuo es secado en el desecador de vacío, después de esto es suspendido en 300 ml. de solución fisiológica de cloruro de sodio y es tratado durante 5 minutos con ultrasonidos de 20 kilohertzios y 125 vatios de potencia. A continuación se somete a centrifugación durante media hora con 30.000 veces la fuerza de la gravedad. La parte sobrenadante es mezclada con sulfato de amonio hasta un 75 % de la concentración de saturación.

15

20

25

405361 22



El precipitado que resulta de este modo es aislado por cen-
trifugación durante una hora con 15.000 veces la fuerza de
la gravedad, es disuelto en 150 ml. de tampón de borato
0,2 molar de pH 8,5 y es dializado frente a este tampón.
5 Este extracto sirve como material de partida para la pre-
paración del reactivo de tripanosomas.

10 ml. de la suspensión al 40 % de látex de po-
liestireno que ha sido caracterizada con más detalle en el
Ejemplo 1 son diluidos a 60 ml. con tampón de borato 0,2
10 molar que contiene 2 % en volumen de glicerina en calidad
de estabilizador. A esta suspensión se añaden 100 mg. de
extracto de tripanosomas disueltos en 100 ml. de tampón de
borato 0,2 molar de pH 8,5. La suspensión es enfriada a
4° C con agitación. Luego se añaden a la mezcla 0,4 ml.
15 de una solución de 2 mg. de benzidina bisdiazotada (prepa-
rada de acuerdo con el Ejemplo 2) por ml. de la mezcla.
Después de agitar durante una hora se añaden gota a gota
15 ml. de una solución al 20 % de albúmina humana y la
suspensión es diluida a 300 ml. con tampón de borato 0,2
20 molar de pH 8,5.

Ejemplo 5

100 mg. de esquistosomas de sexo maduro, los
llamados esquistosomas de adulto, de la especie Schisto-
somas mansoni, el agente patógeno de la bilharziosis o
25 esquistosomiasis de los intestinos y del hígado, secados,

405361

22 AG



obtenidos de manera conocida, son suspendidos en 30 ml.
de una solución que contiene 0,5 % de cloruro de sodio,
0,275 % de bicarbonato de sodio y para-etil-mercuri-tio-
bencenosulfonato sódico (que se encuentra en el comercio
5 bajo el nombre de Thiocid) en una dilución de 1:5000 (Ka-
gan y Pellegrino Bull. WHO 25, 611, 1961). La suspensión
es desintegrada con un homogeneizador de tejido, con en-
friamiento, en baño de hielo a alta velocidad, es manteni-
da durante un día a 4° C, es diluída a 100 ml. con la an-
10 terior solución de cloruro de sodio/bicarbonato de sodio
y es centrifugada durante 30 minutos a 10.000 veces la fuer-
za de la gravedad. La parte sobrenadante es dializada fren-
te a tampón de borato 0,2 molar de pH 8,5, y después de
esto el volumen es de 120 ml. y el contenido de proteínas
15 es de 70 mg.

Este extracto sirve como material de partida pa-
ra la preparación del reactivo de esquistosomas.

10 ml. de la suspensión al 40 % de látex de po-
liestireno que ha sido caracterizada con más detalle en el
20 Ejemplo 1 son diluídos a 60 ml. con tampón de borato 0,2
molar que contiene 2 % en volumen de glicerina en calidad
de estabilizador. A esta suspensión se añaden 70 mg. de ex-
tracto de esquistosomas, disueltos en 120 ml. de tampón
de borato 0,2 molar de pH 8,5. La suspensión es enfriada
25 con agitación a 4° C. Luego se añaden a la mezcla 0,8 ml.



405361

5 de una solución de 2 mg. de benzidina bisdiazotada (preparada de acuerdo con el Ejemplo 2) por ml. de solución. Después de agitar durante una hora se añaden gota a gota 11,3 ml. de una solución al 20 % de albúmina humana y la suspensión es diluida a 300 ml. con tampón de borato 0,2 molar de pH 8,5.

Ejemplo 6

10 Entamoeba histolytica, el agente patógeno de la disentería y en estado avanzado de la amebiasis invasora (absceso de hígado) se obtiene por cultivo axénico de acuerdo con el procedimiento que se describe en I.S. Diamond, J. Parasit. 54, 1047-1056 (1968). A partir de las amebas cultivadas de este modo se obtiene, de acuerdo con procedimientos de fraccionamiento conocidos, una fracción
15 de proteína que al final de la preparación se presenta en forma de solución al 3 % en tampón de borato de sodio 0,2 molar de pH 8,5. La fijación de 10 ml. de esta fracción de proteína en látex de poliestireno se efectúa tal como se describe en el Ejemplo 2, con la modificación de que
20 se emplean 1,2 ml. de una solución al 0,2 % de benzidina bisdiazotada y de que se diluye a 400 ml. con una solución al 1% de albúmina de suero humano en tampón de borato de pH 8,5.

Ejemplo 7

25 El compuesto, descrito en el Ejemplo 2a, de una

405361

22



suspensión de látex de poliestireno y una solución de gam
ma-globulina anti-antígeno de Australia de conejo puede ser
preparada también si el látex de poliestireno Polystyrene-
Latex de la firma The British Drug Houses Ltd. es reempla-
5 zado por los siguientes copolímeros que contienen estireno
al 40 %:

- a) Dispersión de copolímero de estireno/ácido acrílico con
una proporción de ambos componentes de 100/1.
- b) Dispersión de copolímero de estireno/ácido acrílico con
10 una proporción de ambos componentes de 100/3.
- c) Dispersión de copolímero de estireno/ácido metacrílico
con una proporción de ambos componentes de 100/1.
- d) Dispersión de copolímero de estireno/ácido metacrílico
con una proporción de ambos componentes de 100/3.

15 En lo que sigue se dan algunos ejemplos de apli-
cación de los reactivos de acuerdo con el invento.

El preparado con coriogonadotropina (Ejemplo la)
obtenido de acuerdo con el invento es utilizado para la
comprobación de un embarazo. Con antisuero obtenido a par-
20 tir del conejo por inmunización con CGH, se fija la CGH
de la orina de embarazada que es dispuesta previamente en
diluciones crecientes, y el exceso de anticuerpos frente
a CGH es hecho reaccionar con el preparado de acuerdo con
el invento. Si con todas las diluciones se manifiesta una
25 aglutinación, el ensayo es negativo. Por el contrario, si

405361



la aglutinación solo aparece con una determinada dilución el ensayo es positivo y existe un embarazo.

5 Los compuestos de látex de poliestireno e insulina (Ejemplos 1b y 1c) sirven para la detección de anticuerpos de insulina en el suero de diabéticos, que han recibido insulina durante largo tiempo. En el caso de presencia de anticuerpos de insulina, en una serie de diluciones progresivas del suero de diabéticos aparece una aglutinación hasta llegar a una determinada dilución. Con mayores diluciones ya no aparece la aglutinación. Con los compuestos de látex de poliestireno e insulina es posible de
10 tectar anticuerpos de insulina e incluso determinarlos de manera semicuantitativa.

15 El producto obtenido de acuerdo con el invento con anti-inmunoglobulina M (anti-IgM) de conejo (Ejemplo 1d) es un reactivo para la detección o comprobación de una concentración acrecentada de IgM en el suero de recién nacidos. La IgM no es formada normalmente por el feto y tampoco es transmitida desde la circulación sanguínea materna a la circulación sanguínea fetal. Por lo tanto no puede ser detectada en el suero de recién nacidos. No obstante, si el feto ha sufrido una enfermedad intrauterina, por ejemplo sarampión, toxoplasmosis, etc, este feto produce
20 IgM y se comprueba, con el reactivo anti-IgM preparado de acuerdo con el invento, en el suero del recién nacido una
25



concentración relativamente elevada de IgM. El reactivo es apropiado por consiguiente para diagnosticar una enfermedad intrauterina del recién nacido.

5 El preparado obtenido de acuerdo con el invento con gamma-globulina anti-antígeno de Australia de conejo (Ejemplo 1 e) es utilizado para la detección del antígeno de Australia en el suero de donantes de sangre y para la diagnosis de hepatitis del suero, en el cual el antígeno de Australia ya aparece en la etapa prodromal. Con una
10 muestra de suero de un enfermo de hepatitis de suero resulta una aglutinación de la suspensión preparada de acuerdo con el invento. Por el contrario esta suspensión permanece inalterada con una muestra de suero de una persona sana.

15 El agente de diagnóstico de virus de sarampión preparado de acuerdo con el invento (Ejemplo 3b) sirve para la detección de anticuerpos de sarampión en el suero, especialmente de mujeres en edad de maternidad o de capacidad de concepción, dado que las infecciones de sarampión durante el embarazo conducen a daños para el feto,
20 que son designados como embriopatías de virus y son caracterizados por la formación de deformidades congénitas. Si el suero procede de una paciente que ha sufrido una enfermedad de sarampión o ha sido vacunada con vacuna de sarampión,
25 se aglutina el agente de diagnóstico de sarampión

405361



preparado de acuerdo con el invento que ha sido añadido al suero. Por el contrario, si el ensayo se desarrolla de modo negativo, se indica una inmunización con vacuna de sarampión.

5 El producto del procedimiento, que contiene alfa-hemolisina, un producto de metabolismo de los estafilococos, como proteína inmunológicamente activa (Ejemplo 3 c), sirve para la diagnóstico de enfermedades reumáticas. En efecto, con la anti-alfa-hemolisina contenida en el suero
10 de reumáticos se forma una aglutinación. Los valores normales se encuentran entre 2 y 4 unidades, y los valores patológicos se encuentran por encima de éstos. El ensayo es tan sensible que todavía se pueden detectar 1 - 2 unidades de anti-alfa-hemolisina. El producto del procedimiento puede ser ajustado con el suero normalizado del Instituto Serológico Estatal de Copenhage.
15

El reactivo de tripanosomas obtenido correspondientemente al Ejemplo 4 manifiesta una aglutinación con el suero de pacientes que tienen la enfermedad de Chagas.
20 En sueros normales no se presenta la reacción.

El reactivo de esquistosomas preparado de acuerdo con el Ejemplo 5 manifiesta una aglutinación con sueros de pacientes que están enfermos de bilharziosis o esquistosomiasis. Con sueros de personas sanas no se presenta la reacción.
25

22 AGO



405361

Otras posibilidades de utilización son las siguientes:

1) Reactivo de látex-IgE

5 Importancia para diagnóstico: Comprobación de concentración acrecentada de IgE en el suero, en alergias y en enfermedades parasitológicas.

2) Reactivo de látex-IgA

10 Importancia para diagnóstico: Exploración de recién nacidos, comprobación de concentración acrecentada de IgA en el suero de recién nacidos, tal como aparece por ejemplo después de infecciones intrauterinas.

3) Reactivo de látex-alfa₁-fetoproteína

15 Importancia para diagnóstico: Comprobación de alfa₁-fetoproteína en el suero; aparición en carcinoma primario de hígado, raramente en teratoblastoma.

4) Reactivo de látex-PE₁

20 Importancia para diagnóstico: Comprobación de proteína PE₁ específica del embarazo; en el suero y en la orina; diagnóstico del embarazo, control del transcurso del embarazo.

5) Reactivo de látex-amebas

25 Importancia para diagnóstico: Comprobación de anticuerpos frente a amebas, como agente auxiliar diagnóstico en enfermedades de amebas (reconocimiento de la amebiasis invasora).

405361

22



6) Reactivo de látex-LFH

Importancia para diagnóstico: Comprobación de lactógeno de placenta humana en el suero de embarazadas, control del transcurso del embarazo.

5 7) Producto de látex-fibrinógeno-Split D y producto de látex-fibrinógeno-Split E.

10 Importancia para diagnóstico: Para la comprobación de fibrinógeno Split D y E en el suero y en todas las formas de hiperfibrinólisis (por ejemplo coagulopatías de consumo; terapia trombolítica) y comprobación de fibrinopeptiduria en el caso de trasplantes de riñón, nefritis y nefrosis.

8) Reactivo de látex-mioglobina

15 Importancia para diagnóstico: Comprobación de mioglobina en el suero y en la orina, por ejemplo para la diagnóstico precoz del infarto de corazón.

9) Reactivo de látex-haptoglobina.

20 Comprobación de déficit de haptoglobina que podría conducir a complicaciones de transfusión, cuando aparece hemólisis.

405361



REIVINDICACIONES

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

1.- Procedimiento para la preparación de
compuestos de látex de poliestireno y proteínas o péptidos,
10 caracterizado porque se hacen reaccionar entre sí (1) una
suspensión de látex de poliestireno, (2) una proteína o
péptido, y (3) un compuesto de diazonio aromático.

2.- Procedimiento según la reivindicación
1, caracterizado porque se hace reaccionar primero la sus-
15 pensión de látex de poliestireno con un compuesto de dia-
zonio, y a continuación el producto de reacción se hace
reaccionar con una proteína o péptido.

3.- Procedimiento según la reivindicación
1, caracterizado porque el compuesto de diazonio es una
20 2-naftilamina, 7-etoxi-3,9-diaminoacrdina, anilina, feni-
léndiamina, benzidina, dianisidina, diamino-difenilmeta-
no, diamino-difenilsulfona diazotada o un ácido benzidin-
-sulfónico o un ácido para-amino-fenilsulfón-etoxisulfóni-
co diazotado.

25 4.- Procedimiento según la reivindicación 1,

17.5.73

- 26 -

405361 -4 J



caracterizado porque la proteína o el péptido es una albúmina, globulina, proteihormona, una proteína de virus, bacterias, protozoos o helmintos.

5 5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la proteína o el péptido es una IgE-globulina.

6.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la proteína o el péptido es una haptoglobina.

10 7.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la proteína o el péptido es una mioglobina.

15 8.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la proteína o el péptido es un α_1 -antitripsina.

9.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la proteína o el péptido es una proteína de embarazo PE_1 , PE_2 ó PE_3 .

20 10.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la proteína o el péptido es una transaminasa.

11.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la proteína o el péptido es un anticuerpo de sarampión.

25 12.- Procedimiento según la reivindicación

-4 JUN 1973

405361

1, caracterizado porque la proteína o el péptido es un anticuerpo de estafilolisina.

13.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la proteína o el péptido es un anticuerpo de bilharziosis o esquistosomiasis.

14.- Procedimiento para la preparación de compuestos de latex de poliestireno y proteínas o peptidos.

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

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

-4 JUN. 1973

Madrid,

P. A.

Alberto de Elcáburu
Per Pouch

17.5.73

BPD/.