

4 2 3



414618

P.- 54.360

3.01.2 OA/6334-846

F.C. 28-11-75

GON / (07D), J

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION por VEINTE años

a nombre de AKZO N.V.

entidad holandesa

establecida en IJssellaan 82, Arnhem, Holanda

por: "PROCEDIMIENTO MEJORADO PARA LA DETECCION Y DETERMINACION DE HAPTENOS" (Clase Internacional G01n)

2.7.73
C.M.H.

414618



El presente invento se refiere a un método mejorado para la detección y determinación de haptenos poniendo en contacto una muestra de fluido con un conjugado de hapteno y enzima y un anticuerpo contra el hapteno.

5 Más particularmente, el invento se refiere a una determinación de haptenos mejorada en la que la naturaleza de la unión en el hapteno-sustancia de peso molecular elevado empleada para generar el anticuerpo, difiere de la naturaleza de la unión en el conjugado de hapteno y enzima.

10 El presente invento se refiere también a un envase de ensayo que contiene los componentes requeridos en este método de ensayo.

La solicitud de patente holandesa nº 70,16396 describe un método para la detección y determinación, por ejemplo, de haptenos, que consiste en que a un líquido, por ejemplo, un fluido corporal, tal como sangre u orina, que contiene una cantidad desconocida de hapteno, se añaden una cierta cantidad de un producto de unión o copulación de una enzima y el hapteno afin, y una cierta cantidad de anticuerpos
15
20
25
contra este hapteno en una forma insoluble. Después de la adición de estos componentes, tiene lugar una reacción de competición entre estos anticuerpos y el hapteno que ha de ser determinado, por un lado, y los anticuerpos y el hapteno unido a la enzima, por otro lado. Cuanto más grande sea la cantidad del hapteno libre que se encuentra en el líquido,

414618



más grande será la cantidad del conjugado hapteno y enzima que no reaccione con los anticuerpos insolubilizados, permaneciendo por lo tanto dicho conjugado en la fase líquida. En este momento, midiendo la actividad enzimática del conjugado de hapteno y enzima en la fase líquida, o de el conjugado de hapteno y enzima reaccionado en la fase sólida, puede determinarse la cantidad de haptenos en el líquido de ensayo por una curva de respuesta a la dosis para un cierto sistema.

10 La solicitud de patente holandesa nº 70,18838 describe un método correspondiente para la detección y determinación por ejemplo, de haptenos, que difiere del método anteriormente mencionado en que el hapteno que ha de ser determinado y la cantidad de conjugado de hapteno y enzima no se hacen reaccionar con anticuerpos insolubilizados, sino con anticuerpos solubles, siendo añadida al líquido después de la reacción de competición una cierta cantidad de anticuerpos insolubilizados contra los primeros anticuerpos (anti-anticuerpos).

20 La cantidad de conjugado de hapteno y enzima que ha reaccionado con los primeros anticuerpos, se unirá luego a los segundos anticuerpos insolubilizados y, por consiguiente, pasará a la fracción insoluble, mientras que la parte del conjugado de hapteno y enzima que no ha reaccionado, permanecerá en la fase líquida.

414618



5 Del mismo modo que se hace en el método anteriormente descrito, la cantidad de haptenos en el líquido de en sayo puede ser determinada en fase sólida o líquida por una curva de respuesta a la dosis, después de la determinación de la actividad enzimática.

10 La curva de respuesta a la dosis relativa se determina partiendo de una cierta cantidad de conjugado de hapteno y enzima y poniendo a éste en contacto con antisuero (suero que contiene anticuerpos) en diferentes diluciones. En cada dilución, se determina cuanta cantidad de hapteno-enzima está unida a anticuerpos. En este momento, se escoge una dilución de antisuero en la cual, por ejemplo está unido el 80% del hapteno-enzima y a esta dilución se añaden cantidades variables de haptenos. Para cada concentración de hapteno se determina luego cuanta cantidad de hapteno-enzima está unida; por ejemplo, para una unidad de hapteno, 78% de conjugado y para dos unidades de hapteno, 75% de conjugado, etc.

20 Análogamente, añadiendo las cantidades anteriormente mencionadas de hapteno-enzima y antisuero a una cantidad desconocida de haptenos y midiendo la actividad enzimática de la fracción de hapteno-enzima unida o no unida, puede determinarse la cantidad de haptenos en el líquido de ensayo.

25 De lo anterior, resultará evidente que si la afi-

414618



5 nidad del conjugado de hapteno y enzima para el antisuero es elevada en comparación con la afinidad entre el hapteno y el anticuerpo, deben estar presentes cantidades relativamente grandes de haptenos, si ha de tratarse de desplazamiento por el hapteno del conjugado y, consiguientemente, de una actividad enzimática conmensurable en la fase líquida. Por lo tanto, si fuese posible elevar la afinidad del hapteno para los anticuerpos o, al contrario, reducir la afinidad del conjugado de hapteno y enzima para los anticuerpos, la sensibilidad del sistema de ensayo aumentaría con las consecuencias de que con este sistema de ensayo podrían ser determinadas concentraciones muy pequeñas de haptenos.

10 Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que la sensibilidad de los métodos de determinación anteriormente mencionados aumenta considerablemente si la naturaleza de la unión entre el hapteno y la enzima difiere de la naturaleza de la unión entre el hapteno y la sustancia de peso molecular elevado frente a la cual han sido formadas las anti-sustancias.

20 Por una unión de una naturaleza diferente entre el hapteno y la enzima y entre el hapteno y la sustancia de peso molecular elevado, se quiere decir:

- (a) una unión o puente químicamente diferente,
(b) haptenos químicamente diferentes que son inmunológicamente afines,
- 25

414618



- (c) unión por otra posición de la molécula de hapteno,
- (d) combinaciones de (a), (b) y (c).

5 Los haptenos son sustancias exentas de proteínas, principalmente de las de peso molecular bajo, que no son capaces de estimular la formación de anticuerpos, pero que reaccionan con anticuerpos. Los últimos se forman uniendo el hapteno con una sustancia de peso molecular elevado, usualmente un polipéptido o una proteína, e inyectando este producto de unión en seres humanos o animales.

10 Como ejemplos de haptenos se mencionan: esteroides, tales como estrona, estradiol, estriol, testosterona, pregnanodiol y progesterona; vitaminas, tales como vitamina B₁₂ y ácido fólico; tiroxina, tri-yoduro de tironina, histamina, serotonina, digoxina, prostaglandina, adrenalina, nor-adrenalina, morfina, hormonas vegetales, tales como auxina, cinetica y ácido giberélico, y antibióticos, tales como penicilina.

20 Para la preparación del producto de unión de hapteno-enzima pueden ser empleados usualmente los sustituyentes que ya se encuentran presentes en estos componentes, tales como grupos hidroxilo, carboxilo, amino o ceto. Si no se encuentra presente ninguno de estos grupos, es posible introducirlos todavía, particularmente en haptenos. Así, por ejemplo, en esteroides puede introducirse un grupo hidroxilo, 25 por vía microbiológica o química, en diversas posiciones de

414618



la molécula, tales como las posiciones 6, 11 ó 16.

5 Por medio de un ácido policarboxílico, o uno de sus derivados funcionales, tales compuestos hidroxílicos pueden ser unidos con una enzima. También es posible partir de un hapteno que posea un grupo ceto, o en el cual haya sido introducido tal grupo, después de lo cual puede tener lugar la unión con la enzima a través de un derivado de carboxialcoholoxima. Si el hapteno, al igual que la enzima, posee grupos amino o carboxilo, los dos componentes pueden ser unidos por un método conocido en la síntesis de péptidos.

10 Dependiendo de la presencia de sustituyentes adecuados, también pueden ser usadas para la unión otras sustancias, tales como dialdehidos, por ejemplo, aldehido glutárico, hidrazinas, difluorodinitrodifenilsulfona, di-isocianatos, tales como toluendisisocianato di- o tri-clorotriazinas.

15 La enzima que ha de emplearse para el conjugado descrito anteriormente puede en principio elegirse de cualquier clase, pero se da preferencia a las enzimas que poseen una actividad específica elevada, que puede ser determinada de un modo sencillo, por ejemplo, colorimétricamente, espectrofotométricamente, o fluorométricamente.

20 Como ejemplos de enzimas que se emplean preferiblemente, se mencionan: catalasas, peroxidasas, glucuronidasas, glucosidasas, galactosidasas, ureasa y oxidoreductasas

414618



tales como glucosa-oxidasa y galactosa-oxidasa.

5 Para la preparación de anticuerpos contra el hap-
teno, éste se une con una sustancia de peso molecular ele-
vado, usualmente una proteína, y se inyecta a un animal, des-
pués de lo cual el anticuerpo se aísla de la manera conven-
cional.

10 Para la unión del hapteno con una proteína, o po-
siblemente otra sustancia de peso molecular elevado capaz
de estimular la formación de anticuerpos, pueden emplearse
los mismos métodos de unión que se describen para la unión
del hapteno con una enzima.

15 Sin embargo, es esencial para el procedimiento de
acuerdo con el invento que la naturaleza de la unión difiera
de la del conjugado de hapteno y enzima. La diferencia pue-
de ser de naturaleza química debido a que en el conjugado
de enzima la unión ha sido efectuada, por ejemplo, a través
de un ácido policarboxílico, mientras que la unión entre el
hapteno y la proteína ha sido hecha a través de un puente
de carboximetiloxima. También es posible que en ambos casos
20 la unión haya sido efectuada a través de un ácido policar-
xílico, por ejemplo, un ácido dicarboxílico, si en uno de
los casos el ácido dicarboxílico contiene X átomos de carbo-
no, por ejemplo dos, en el caso del ácido oxálico, y en el
otro caso Y átomos de carbono, por ejemplo cuatro, en el ca-
so del ácido succínico.

414618



También puede efectuarse una naturaleza diferente de la unión si el hapteno en el conjugado de hapteno y enzi
ma y el hapteno en el producto de hapteno-sustancia de peso
molecular elevado son químicamente diferentes pero inmunoló
gicamente afines. Esta diferencia química aparece si ambos
5 haptenos difieren en la ausencia o presencia de uno o más
dobles enlaces, por ejemplo, testosterona y dihidrotestostero
na, y/o uno o más sustituyentes tales como grupos hidroxilo,
grupos oxo, átomos de halógeno, grupos alcoholo etc., por
10 ejemplo estradiol y 11 α -hidroxi-estradiol, o si un hapte
no es un derivado funcional, por ejemplo un acilato o éter,
del otro hapteno, por ejemplo, morfina y codeína.

Se ha demostrado incluso que es posible obtener un sistema de ensayo más sensible empleando los mismos ti
pos de uniones en ambos productos de copulación o unión, si
15 las uniones han sido formadas a través de otra posición de
la molécula de hapteno, por ejemplo, en el caso del estra
diol en calidad de hapteno, pasando por los derivados 11-suc
ciniloxi y 17-succiniloxi de 11-hidroxi-estradiol.

Los anticuerpos producidos de este modo se emplean en el método de determinación de acuerdo con el invento ha
ciéndolos reaccionar durante un período de tiempo dado con
20 la cantidad de haptenos que ha de ser determinada y con una
cantidad del producto de copulación o unión, y separando
25 luego el producto de copulación o unión libre del producto

2.7.73
C.M.H.

24



414618

de copolución o unión unido a los anticuerpos.

Para la separación pueden emplearse diversos métodos, tales como precipitación del producto de unión unido a anticuerpos con un disolvente orgánico o una sal, absorción selectiva del producto de unión libre sobre carbón vegetal recubierto con una capa de dextrana, o precipitación del producto de unión unido a los anticuerpos por medio de (segundos) anticuerpos contra los anticuerpos de la especie del animal en que habían sido producidos los anticuerpos contra el hapteno. Este último método es usualmente denominado método del "doble anticuerpo".

La separación puede también efectuarse fácilmente insolubilizando los anticuerpos contra el hapteno antes de permitirles que tomen parte en la reacción con el hapteno y el producto de unión. La separación tiene lugar luego de un modo bastante fácil por centrifugación. Este método se denomina frecuentemente método de "fase sólida". Los anticuerpos pueden insolubilizarse por reticulación, por ejemplo, con aldehído glutárico o un éster alcohólico de ácido clorofórmico, o uniéndolos a un vehículo insoluble, tal como celulosa, agarosa, poliestireno y similares.

Los métodos del "doble anticuerpo" y de "fase sólida" pueden combinarse en el denominado método DAFS. En este caso, se prepara un segundo anticuerpo contra el primer anticuerpo inyectando la fracción de inmunoglobulina del pri

414618



mer antisuero, o de suero normal de la misma especie de animal, en una especie de animal diferente de aquella de la que fue primeramente obtenido el antisuero e insolubilizando luego el segundo antisuero por los métodos descritos anteriormente para insolubilizar el primer anticuerpo, por ejemplo, copulación o unión con partículas de celulosa.

Para la realización del procedimiento de acuerdo con el invento se emplea preferiblemente un envase de ensayo.

Un envase de ensayo para el método de determinación que emplea un anticuerpo insolubilizado consiste principalmente en:

- (1) una cierta cantidad del producto de unión de un hapteno y una enzima; y
- (2) una cierta cantidad de un anticuerpo en una forma insoluble.

Un envase de ensayo para la realización del método de determinación de acuerdo con el invento por medio de un segundo antisuero insolubilizado (es decir, el método DAFS), consiste principalmente en:

- (1) una cierta cantidad del producto de unión de un hapteno y una enzima;
- (2) una cierta cantidad del primer antisuero; y
- (3) una cierta cantidad del segundo antisuero insolubilizado.



414618

Además de los reactivos anteriores, ambas realizaciones de estuches o envases de ensayo del invento pueden contener componentes adicionales, por ejemplo, reactivos para determinar la actividad de la enzima empleada. El invento se ilustra por los ejemplos siguientes.

EJEMPLO 1

DETERMINACION DE ESTROGENO

A.- Preparación de estradiol-17-succinil-PRP y 11 α -estradiol-11-succinil-PRP

10 Cincuenta mg. estradiol-17-hemisuccinato ó 50 mg. de 11 α -OH-estradiol-11-hemisuccinato se disolvieron en 2 ml. de dioxano. La mezcla se enfrió a 8°C, después de lo cual se añadieron 0,07 ml. de tri-n-butyl-amina y 0,015 ml. de clorocarbonato de isobutilo. Treinta minutos después de esto, se añadieron 50 mg. de peroxidasa de rábano picante (PRP) disueltos en 7,5 ml. de agua-dioxano (3:2) de pH 9. La mezcla se hizo reaccionar durante 4 horas, después de lo cual se dializó durante la noche frente a agua corriente y luego se purificó en una columna con Sephadex G-25 en agua destilada. Las fracciones que contenían enzimas se liofilizaron. La purificación adicional de los conjugados fue obtenida por centrifugación con gradientes de densidades (20-60% de sacarosa; 16 horas, 238.000 x g^{*}).
20
25

* (g=aceleración de la gravedad)

414618



B.- Preparación de estradiol-17-succinil-ASB y 11 α -estra-
diol-11-succinil-ASB.

5 Estos conjugados se prepararon del mismo modo que los correspondientes derivados PRP, pero los materiales de partida eran 50 mg. de estradiol-hemisuccinato y 150 mg. de ASB (albúmina de suero de bovino). Además, la mezcla se precipitó tres veces con 1,5 partes en volumen de acetona de pH 4,5 en lugar de ser purificada con Sephadex G-25.

10 C.- Preparación de anticuerpos contra estradiol-17-succinil-
-ASB y 11 α -estradiol-11-succinil-ASB

Se inmunizaron conejos con los productos preparados en B de acuerdo con el siguiente esquema:

Tiempo (días)	0	14	28	42	49
Cantidad (mg.)	0,25	0,25	0,25	0,25	sangrando
15 Sitio	i.m.	i.m.	i.m.	i.v.	
Coadyuvante					
de Freund	+	+	+	-	
	i.m. = intramuscularmente				
	i.v. = intravenosamente				

20 D.- Determinación de estrógeno

En un ensayo preliminar, se determinó para cada antisuero qué parte de la actividad enzimática de cada conjugado de estradiol y PRP (en una concentración adecuada de terminada de antemano) estaba unida por cual concentración de antisuero: 0,5 ml. de tampón, 0,1 ml. de estradiol-PRP y

25



414618

0,1 ml. de antisuero (en diluciones de desde 1:100 hasta 1:10.000) fueron incubados a temperatura ambiente durante treinta minutos. Luego, se añadieron 0,3 ml. de una suspensión de anti-conejo DAFS (anticuerpos de ovejas contra la gamma-globulina de conejo, unidos por enlace covalente a 5 celulosa), y la mezcla resultante se agitó durante dos horas. Luego, la mezcla se centrifugó, y después de que se mezclaron 0,5 ml. del líquido sobrenadante con 1,5 ml. del substrato de enzima (80 mg. de ácido 5-amino-salicílico y 10 μ l de una solución de peróxido de hidrógeno al 30% en 150 ml. de tampón de fosfato 0,02 M de pH 6,0). Después de una hora, se midió la extinción a 450 nm. Para las siguientes determinaciones de estrógeno se eligió siempre la dilución de antisuero en que aproximadamente el 40% de la actividad enzimática del estradiol-PRP estaba unida al anti-conejo DAFS en ausencia de estrógeno libre. 0,5 ml. de una solución de estrona, estradiol o estriol (concentraciones de desde 0,1 a 1.000 ng/ml.) fueron incubados durante 30 minutos con 0,1 ml. de antisuero en una dilución establecida, después de lo cual se añadieron 0,1 ml. de estradiol-PRP en la concentración elegida y la mezcla se incubó de nuevo durante 30 minutos. Luego, se añadieron 0,3 ml. de una suspensión anti-conejo DAFS y la determinación se realizó además como se ha descrito en lo que antecede. La sensibilidad de los métodos de determinación resultantes se muestra en la



414618

Tabla siguiente.

Cantidad de estrógeno en ng/ml requerida para inhibir la mitad del estradiol-PRP de unirse al anticuerpo					
5	Antisuero contra	E ₂ -11-BSA		E ₂ -17-BSA	
	conjugado	E ₂ -11-HRP	E ₂ -17-HRP	E ₂ -11-HRP	E ₂ -17-HRP
10	estrona	1000	7	3	7
	estradiol	800	1,5	2	7
	estriol	1000	230	14	380

E₂ = estradiol.

Se obtuvieron resultados similares con diversos antisueros. A no ser que se establezca otra cosa, se empleó en calidad de tampón fosfato 0,1 M de pH 6,0 que contenía 0,1% de lactalbúmina.

EJEMPLO II

DETERMINACION DE ESTROGENO

A.- Preparación de estradiol-17-succinil-PRP, estradiol-17-maleinil-PRP, estradiol-17-glutaril-PRP y estrona-17-N-carboximetiloxima-PRP.

Estos productos se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo I A, siendo adaptadas las cantidades de los derivados de estrógeno a sus pesos moleculares respectivos, y siendo realizada la reacción con la estrona-17-O-(carboxime



414618

til)oxima en una mezcla de dimetilformamida/agua en lugar de una mezcla de dioxano/agua.

B.- Determinación de estrógeno

5 La determinación se realizó como se ha descrito en el Ejemplo ID, empleando dos antisueros contra el estradiol-17-succinil-ASB(vease los Ejemplos I B y C). La sensibilidad de la determinación se da en la Tabla siguiente.

10

Concentraciones de estrona (E_1), estradiol (E_2), y estriol E_3 en ng/ml requeridas para inhibir la mitad de estradiol-PRP de unirse al anticuerpo						
Antisuero	Conejo A			Conejo B		
	E_1	E_2	E_3	E_1	E_2	E_3
15 succinil	4	6	190	12	9	300
maleinil	3	4	160	3	3	100
glutaril	4	5	150	8	6	300
oxima	2	2	150	1	0,8	50

EJEMPLO III

20

DETERMINACION DE PROGESTERONA

A.- Determinación de 11α -OH-progesterona-11-succinil-fosfatasa alcalina (FA) y 12α -OH-progesterona-12-succinil-FA

25 Estas sustancias fueron preparadas análogamente a los derivados de estrógeno descritos en el Ejemplo I A, pero

414618



los materiales de partida eran 55 mg. de progesterona-hemisuccinato y 125 mg. de FA.

5 B.- Preparación de 11 α -OH-progesterona-11-succinil-ASB y 12 α -OH-progesterona-12-succinil-ASB.

Estas sustancias fueron preparadas de modo análogo a los derivados de estrógeno descritos en el Ejemplo I B.

10 C.- Preparación de anticuerpos contra 11 α -OH-progesterona-11-succinil-ASB y 12 α -OH-progesterona-12-succinil-ASB.

Para la preparación de estos anticuerpos, se siguió el esquema del Ejemplo I C.

D.- Determinación de progesterona.

15 El método adoptado no difería esencialmente del método descrito para la determinación de estradiol en el Ejemplo I C. La determinación de la enzima tuvo lugar como sigue: 0,5 ml. de una muestra que contenía la enzima se añadieron a 0,5 ml. de una solución de substrato (p-nitrofenil fosfato 0,01 M en un tampón de carbonato 0,1 M de pH = 2, 20 siendo 0,007 M en MgCl₂). La mezcla se incubó a 37° C durante 30 minutos, después de lo cual se midió la extinción a 400 nm.

25 Se encontró que los sistemas de determinación en los cuales la progesterona-11-FA se combinaba con antiprogesterona-11-ASB, o la progesterona-12-FA con antiprogesterona-



414618

-12-ASB eran 4 a 10 veces menos sensibles a la progesterona que los sistemas de progesterona-11-FA/antiprogesterona-12-ASB y progesterona-12-FA/antiprogesterona-11-ASB.

5 Las reacciones descritas en este Ejemplo se realizaron, a no ser que se indique lo contrario, en tampón de veronal 0,01 M de pH 7,5, que contenía 0,01% de lactalbúmina.

E.- Determinación de progesterona.

10 Se obtuvieron resultados similares a los descritos en el Ejemplo III D con el siguiente método de ensayo: 0,5 ml. de una solución de progesterona se incubaron con 0,1 ml. de antisuero en una dilución adecuada, durante treinta minutos, después de lo cual se añadió 0,1 ml. de progesterona-15 -FA en una concentración adecuada, y la mezcla se incubó de nuevo durante treinta minutos. Luego, se añadieron 0,3 ml. de una suspensión de Norit (25 mg/ml.) incubada de antemano con dextrana y luego lavada, después de lo cual la mezcla se centrifugó durante quince minutos y se determinó la actividad de FA en el líquido sobrenadante como se ha descrito en el Ejemplo III D.

EJEMPLO IV

DETERMINACION DE ACIDO FOLICO

A.- Preparación de folato-ASEM.

25 25 mg. de 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)-carbodiimida y luego 20 mg. de ácido fólico fueron añadidos a 50



414618

5 mg. de albúmina de suero de bovino metilada (ASBM) en 5 ml. de tampón de fosfato 0,05 M de pH 7,0. La mezcla se hizo reaccionar durante dos horas, después de las cuales se dializó frente a agua destilada exhaustivamente y luego se liofilizó.

B.- Preparación de antisueros contra folato-ASBM.

En este procedimiento, se empleó el esquema del Ejemplo I C.

10 C.- Preparación de folato-glucosa oxidasa (FGO) y pteroil-glucosa oxidasa (PGO)

Un mg. de ácido fólico ó 0,7 mg. de ácido pterico se disolvieron en 5 ml. de tampón de fosfato 0,05 M de pH 7, que contenía 0,5 mg de 1-ciclohexil-3-(2-morfolino-etil)-carbodiimida. Después de 5 minutos, se disolvieron en esta 15 mezcla 50 mg. de glucosa-oxidasa, y la reacción se continuó durante 2 horas. Luego la solución se dializó frente a un tampón de fosfato de 0,05 M a pH 7,0 durante un tiempo considerable.

D.- Determinación del ácido fólico

20 El método de determinación era esencialmente igual al descrito en el Ejemplo I D. La determinación de la enzima se realizó como sigue: 0,5 ml. de la solución que contenía la enzima se mezclaron con 2,5 ml. de la solución del sustrato (50 mg. de glucosa, 10 µg. de peróxidasa y 1 mg. de 25 ácido 5-aminosalicílico en tampón de fosfato 0,05 M de pH



414618

6,0), y después de ello se midió la extinción a 450 nm durante 30 minutos. El método de ensayo en el cual los anticuerpos contra el folato-ASBM fueron combinados con FGO demostraron ser tres a veinte veces menos sensibles que en el que los anticuerpos se combinaron con PGO. La diferencia en sensibilidad variaba para cada antisuero individual.

EJEMPLO V

DETERMINACION DE ESTROGENO

10 A.- Preparación de 11α -OH-estróna-11-succinil-PRP, 11α -OH-estróna-11-glutanil-PRP, 11α -OH-estradiol-11-succinil-PRP y 11α -OH-estradiol-11-glutanil-PRP

15 Estos compuestos se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo I A. Las cantidades de derivados de estrógeno empleadas han sido adaptadas de acuerdo con sus pesos moleculares.

B.- Determinación de estrógeno

20 La determinación se realizó con los cuatro conjugados E-PRP, anteriormente mencionados, empleando el antisuero contra 11α -OH-estradiol-11-succinil-ASB descrito en los Ejemplos I B y I C.

Las sensibilidades de las determinaciones se dan en la Tabla siguiente:



414618

Cantidad de estrógeno en ng/ml requerida para inhibir a la mitad del estrógeno-PRP de unirse al anticuerpo.		
Conjugado-E-HRP	R ₁	E ₂
5 E ₂ -11-succinil-HRP	>1000	>1000
E ₂ -11-glutanil-HRP	>1000	8
E ₁ -11-succinil-HRP	>1000	5
E ₁ -11-glutanil-HRP	80	0,8

10

EJEMPLO VI

DETERMINACION DE ESTROGENO

A.- Preparación de estradiol-17-succinil-PRP y estriol-16,17-disuccinil-PRP.

15

Estos compuestos se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo I A, teniendo en cuenta los pesos moleculares de los derivados de estrógeno.

B.- Preparación de anti(estradiol-17-succinil-ASB) y anti(estriol-16,17-disuccinil-ASB)

20

Estos antisueros fueron preparados como se ha detallado en los Ejemplos I A y I B.

C.- Determinaciones de estrógeno.

25

Las cuatro combinaciones posibles de conjugado de estrógeno y PRP y antisueros fueron empleadas para la determinación de estrógeno, tal como se describe en el Ejemplo I D.

414618



Los resultados para dos antisueros se presentan en la Tabla siguiente:

5

Cantidad de estrógeno en ng/ml requerida para inhibir la mitad del estrógeno-PRP de la unión al anticuerpo.				
Antisuero contra	E ₂ -17-BSA		E ₃ -16,17-BSA	
	E ₂ -17-HRP	E ₃ -16,17-HRP	E ₂ -17-HRP	E ₃ -16,17-HRP
10 estrona	>300	6	30	100
estradiol	>300	16	30	150
estriol	>300	70	100	300

EJEMPLO VII

DETERMINACION DE MORFINA

15

A.- Preparación de codeína-6-succinil-PRP.

De acuerdo con el método que se ha descrito en el Ejemplo I A el codeína-6-hemisuccinato ha sido convertido en codeína-6-succinil-PRP.

20

B.- Preparación de morfina-3,6-diglutaril-ASB y preparación de antisuero contra este producto.

De acuerdo con el método que se ha descrito en el Ejemplo I B, la morfina-3,6-dihemiglutarato se convirtió en morfina-3,6-diglutaril-ASB y el antisuero contra este producto se preparó como se ha descrito en el Ejemplo I C.

25



414618

C.- Determinación de morfina

De acuerdo con el método que se ha descrito en el Ejemplo I D la cantidad de morfina se determinó en una muestra en la cual las fases sólida y líquida fueron separadas empleando anti-conejo DAFS.

Se requerían 10 ng./ml. de morfina para la inhibición del 50% de la unión de codeína-6-succinil-PRP a anti-suero contra morfina-3,6-diglutaril-ASB..

EJEMPLO VIII

DETERMINACION DE TESTOSTERONA

A.- Preparación de 11 α -OH-testosterona-11-succinil-PRP, 11 α -OH-dihidrotosterona-11-succinil-PRP y 11 α -OH-nortestosterona-11-succinil-PRP.

Estos compuestos fueron preparados de acuerdo con los métodos empleados para los estrógenos en el Ejemplo I A.

B.- Preparación de anti(11 α -OH-testosterona-11-succinil-ASB).

Este antisuero se preparó como se ha descrito en el Ejemplo I B y C., para los antisueros de estrógeno.

C.- Determinación de testosterona.

La testosterona fue analizada con el método descrito para los estrógenos en el Ejemplo I D.

Cuando se emplea la testosterona-PRP, fueron requeridos 30 ng/ml. de testosterona para la inhibición del 50%

414618



5 de la unión del conjugado al antisuero. Sin embargo, cuando se emplea el mismo antisuero y dihidrotestosterona-PRP, 5 ng./ml. de testosterona eran suficientes para conseguir la misma respuesta. La nortestosterona-PRP era de una sensibilidad intermedia, requiriendo 15 ng./ml. de testosterona para la inhibición del 50% de su unión a los anticuerpos.

10 La presente solicitud, que corresponde a la presentada en Holanda, el 11 de Mayo de 1972, bajo el Nº 72.06373, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

15

REIVINDICACIONES

20

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 que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

25

1ª.- Procedimiento mejorado para la detección y determinación de haptenos poniendo en contacto una muestra

me
2.7.73
C.M.H.



414618

de fluido con cantidades previamente determinadas de un con-
jugado de hapteno y enzima y una proteina de fijación espe-
cifica para el hapteno y el conjugado de hapteno-enzima, ha-
ciendo con ello que el conjugado de enzima compita para la
5 proteina de fijación especifica, con el hapteno libre que
puede estar presente en la muestra, separando la proteina
unida al conjugado de enzima del conjugado no unido, y mi-
diendo la actividad enzimática en cualquiera de las porcio-
nes separadas, siendo dicha actividad característica de la
10 cantidad de hapteno en la muestra analizada, caracterizado
porque la mejora comprende el empleo de un conjugado de hap-
teno y enzima en donde la naturaleza de la unión entre la
enzima y el hapteno del conjugado difiere de la unión en el
hapteno-sustancia de alto peso molecular empleado para gene-
15 rar la proteina de fijación especifica.

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, en
donde la separación de la proteina unida y el conjugado de
hapteno y enzima no unido se efectúa poniendo en contacto
la muestra que se analiza con una proteina de fijación in-
20 solubilizada especifica para la proteina empleada para unir
el hapteno y el conjugado de hapteno y enzima.

3ª.- Procedimiento según la reivindicación 2ª, en
donde el hapteno es un derivado de estrógeno.

4ª.- Procedimiento según la reivindicación 2ª, en
25 donde el hapteno es progesterona.

ME

2.7.73
C.M.H.



414618

5^a.- Procedimiento según la reivindicación 2^a,
en donde el hapteno es ácido fólico.

5
6^a.- Procedimiento según la reivindicación 1^a,
en donde la proteína de fijación específica para el hapteno
y el conjugado de hapteno y enzima se emplean en forma insolubilizada para efectuar automáticamente una separación entre la proteína unida y el conjugado de hapteno y enzima no unido a medida que transcurre la reacción de competición.

10
7^a.- Procedimiento mejorado para la detección
y determinación de haptenos.

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

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

15

Madrid,

1 ABO. 1975

P.A.

Alberto de Elizabete

Por Poder.

ME

30-7-75
VGD.