



416801

Int. Cl.: G12K. // GOIN

F.C.-26-~~11~~-75

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

a favor de

ISTITUTO FARMACOLOGICO SERONO S.p.A., de nacionalidad italiana,
residente en Vía Casilina 125, Roma (Italia) por:

"PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UN ANTISUERO ESPECIFICO
PARA DETERMINACIONES RADIOINMUNOLOGICAS".

Memoria descriptiva

Las técnicas inmunológicas de determinación de hormonas se basan en la capacidad de una determinada hormona para actuar como antígeno en una determinada reacción inmunológica.

5

A base de este principio, se han creado recientemente unas técnicas de determinación radioinmunológica en las cua

416801

- 2 -



les una cantidad desconocida de hormona sin radioactivar (fría) que tiene que ser determinada, es incubada, en presencia de una conocida cantidad de la misma hormona radioactivada, con una adecuada cantidad de un antisuero específico. Así, una cantidad desconocida de hormona puede ser determinada fácilmente mediante el contaje de radioactividad del complejo antígeno-anticuerpo por comparación con una curva standard trazada previamente empleando cantidades conocidas del antisuero específico, de hormona sin radioactivar y de hormona radioactivada, habiendo concurrido proporcionalmente (es decir, en proporción a sus cantidades respectivas) tanto las hormonas sin radioactivar como las radioactivadas en la formación de dicho complejo antígeno-anticuerpo. Naturalmente, el contaje de radioactividad de dicho complejo antígeno-anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de hormona sin radioactivar añadida a la mezcla de la reacción, dejándose invariadas las cantidades de antisuero y de hormona radioactivada.

Desgraciadamente, las técnicas de determinación radioinmunológica no han sido aplicables hasta aquí a la determinación de la gonadotropina coriónica humana (GCH) en presencia de cantidades comparables de hormona luteinizante porque es extremadamente difícil obtener un antisuero específico para cualquiera de dichas hormonas.

Por otra parte, la necesidad de medios seguros que permitan realizar dicha determinación está particularmente ad



416801

mitida en este campo. En efecto, es sabido que tales medios seguros, entre otras cosas permitirían reconocer rápidamente (en un plazo de pocos días a partir de la concepción) el embarazo, y descubrir y controlar el coriocarcinoma así como cualesquiera otros tumores productores de GCH.

Por consiguiente, es claramente evidente la enorme utilidad clínica de tal antisuero específico en la diagnosis y en el control de dichos tumores, así como en la determinación precoz del embarazo.

Muy recientemente, Ross y otro(s), en "Structure-activity relationships of protein and polypeptide hormones", Parte 1 - Reports-Proceedings of the Second International Symposium Liege, September 28 - October 1, 1971; págs. 153-7; M. Margoulies and F.C. Greenwood Editors; publicada por Excerpta Medica (1971), han ensayado antisueros producidos contra las subunidades α y β de GCH (llamadas respectivamente a continuación GCH- α y GCH- β ,) en las reacciones radioinmunológicas y comprobaron que el antisuero creado contra la GCH- β tiene una mayor especificidad.

Por una exposición gráfica en la cual, entre otras curvas, pueden verse dos curvas de inhibición de la reacción radioinmunológica entre suero anti-GCH- β y GCH- β radioactivada, construidas usando GCH y respectivamente HL pituitaria humana, puede advertirse que las dos curvas de inhibición mencionadas difieren en su inclinación.



169

416801

60 Sin embargo, desde el punto de vista cuantitativo, las dos curvas son casi coincidentes, cuando menos en lo que concierne a las partes correspondientes a bajos niveles de hormona sin radioactivar (es decir, hasta aproximadamente 250-300 m U.I./ml).

65 A este respecto, debe advertirse que los bajos niveles de hormona anteriormente mencionados son precisamente los niveles a los cuales se necesita una discriminación entre la hormona GCH y HL; ya que los niveles fisiológicos de HL en la orina pueden elevarse a lo sumo a 150 m U.I./ml. Por consiguiente, la técnica creada por Ross y otro(s) no puede ser usada como procedimiento standard de determinación de GCH en presencia de cantidades comparables de HL.

70 Tal como se usa aquí, "m U.I." significa una milésima parte de la Unidad Internacional adoptada por la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization) a base de la importante preparación de referencia que es el "Segundo Standard Internacional para GCH", cuando se trata de GCH o de
75 la "Segunda preparación Internacional de Referencia GMH", cuando se trata de HL. Ambas preparaciones de referencia mencionadas pueden obtenerse del Departamento de Standards Biológicos de la Organización Mundial de la Salud, Inglaterra.

80 Tal como se usa aquí, "cantidades comparables de HL" significa cantidades de esta hormona (expresada en términos de m U.I./ml) hasta 10 veces aproximadamente las de GCH.



416801

Según la presente invención, se ha comprobado que, cuando se usa un antisuero GCH- β que ha sido previamente absorbido con GCH- α , las curvas de inhibición resultantes con respecto a GCH y HL son tales que se requieren cantidades de HL cuando menos 10 veces superiores a las cantidades de GCH para conseguir un grado equivalente de inhibición en la reacción radioinmunológica.

Por consiguiente, la invención proporciona un nuevo antisuero, altamente especializado para determinaciones radioinmunológicas, que es obtenido absorbiendo suero anti-GCH- β con subunidad GCH- α .

Como ilustra el Ejemplo siguiente, el procedimiento de determinación basado en el uso del antisuero específico de la presente invención puede ser aplicado a la determinación radioinmunológica de GCH en presencia de HL no sólo en una solución tamponada, por ejemplo tamponada con fosfato, sino incluso directamente en una muestra de orina humana.

El antisuero GCH- β , del cual se obtiene el antisuero altamente específico de la presente invención, puede ser preparado, como de costumbre, inyectando GCH- β humana en animales tan distintos como el conejo, la oveja, la cabra, la cavia y otros más.

Por razones de conveniencia, se prefiere un animal corriente de laboratorio, particularmente el conejo.

Se ha empleado un plan de inmunización similar al

416801

- 6 -



110 sugerido por Ross. Sin embargo, debe quedar entendido que la invención no se limita a este plan particular de inmunización, ya que este último puede ser cambiado según la clase de animal, los adyuvantes especiales usados, etc.

115 En general, la absorción de antisuero GCH- β es realizada empleando cantidades tales de GCH- α que se obtiene al final, en el antisuero, la más alta especificidad. Tales cantidades pueden variar algo según el antisuero particular usado. Según la presente invención, van corrientemente de 0,05 a 5 mg GCH- α por ml de antisuero GCH- β ; un campo preferido es el de 0,1 a 2 mg de GCH- α por ml de antisuero HCG- β un campo todavía más preferido es el de 0,1 a 0,4 mg de GCH- α por ml de antisuero GCH- β .

120 Tal como se usa aquí, el término "absorción" tiene su significado generalmente aceptado en inmunología, es decir que se refiere a un procedimiento para hacer reaccionar un antisuero con un determinado antígeno, para eliminar del antisuero el anticuerpo que reacciona específicamente con ese antígeno. El tiempo y la temperatura de tal reacción inmunológica no son críticos. La reacción conduce a un complejo insoluble antígeno-anticuerpo, que es centrifugado y eliminado para producir un sobrenadante antisuero "absorbido" (purificado).

130 El Ejemplo siguiente ilustra una preparación típica del antisuero específico de la presente invención.

410801



Ejemplo 1

Preparación de un antisuero GCH- β

135 Usando inyecciones intradérmicas administradas en muchos puntos del cuerpo, se le administró a un grupo de conejos una mezcla homogeneizada con ultrasonido consistente en 50 γ (microgramos) de GCH- β , disueltos en 1 ml de solución salina fisiológica más 1 ml de adyuvante completo de Freund (DIFCO) más 5 mg de micobacterias de tubérculos secadas (H37RA DIFCO).

140 En un punto distinto del cuerpo, se le administraron a cada conejo, por vía subcutánea, 0,5 ml de vacuna contra la tos ferina.

145 Un mes después, se inyectó por vía intradérmica una mezcla constituida por 50 γ de GCH- β disueltos en 1 ml de solución salina fisiológica más 1 ml de adyuvante completo de Freund.

150 Los animales fueron sangrados primero mediante pun- tura de la vena marginal de la oreja una semana después de la última inyección mencionada. La sangre, recogida en un matraz de Erlenmeyer, fué dejada cuajar manteniendo el matraz incli- nado a temperatura ambiente durante aproximadamente 4 horas, y luego verticalmente, durante la noche, a 42 C. La sangre coagulada fué centrifugada la mañana siguiente para separar el suero, al cual se le añadió azida de sodio (1 - 10.000 pe- so/volumen). En este contexto, las partes en peso y las partes

416801

- 8 -



en volumen tienen la misma relación que los miligramos y los mililitros.

Después, los animales fueron sangrados semanalmente. Cuando el título del antisuero tendía a bajar, los animales recibían por vía subcutánea una inyección reforzadora consistente en 50 γ GCH- β disueltos en 1 ml de solución salina fisiológica.

Absorción de antisuero GCH- β con GCH- α .

Se añadieron 0,2 mg de GCH- α a 1 ml de antisuero GCH- β . Se mantuvo la mezcla durante 2 horas a 37 $^{\circ}$ C. en un termostato, y luego, durante 24 horas, a 4 $^{\circ}$ C.

Se formó un precipitado que se centrifugó y se tiró.

El antisuero absorbido sobrenadante fué hallado altamente específico con respecto al GCH en presencia de cantidades comparables de HL.

En el procedimiento de la presente invención pueden introducirse varios cambios y modificaciones sin apartarse del espíritu y del alcance de la misma. Las distintas formas de realización expuestas en la presente Memoria tienen el fin de ilustrar ulteriormente la invención, pero no de limitarla.

Esta patente de invención se corresponde a la depositada en Italia con el núm. 51 583 A/72 y tiene prioridad de fecha 17 de julio de 1972 por acogerse a los beneficios del artículo 21 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial y del artículo 4 $^{\circ}$ del Convenio de la Unión de París.

416801



REIVINDICACIONES

- 185 1). Procedimiento para la obtención de un antisuero específico para determinaciones radioinmunológicas, caracterizado por que antisuero de gonadotropina- β coriónica humana, que ha sido obtenido mediante inyección de gonadotropina- β humana a un animal adecuado, preferentemente de laboratorio y siguiendo un plan de inmunización conveniente, es sometido a un proceso de absorción con gonadotropina- α coriónica humana, recuperándose posteriormente el antisuero.
- 190 2). Procedimiento de conformidad con la reivindicación 1), caracterizado porque el proceso de absorción se realiza con utilización de cantidades variables de gonadotropina- α coriónica humana, que van corrientemente de 0,05 a 5 mg. y más particularmente con 0,1 a 0,4 miligramos por cada mililitro de antisuero de gonadotropina- β coriónica humana.
- 195 3). "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UN ANTISUERO ESPECIFICO PARA DETERMINACIONES RADIOINMUNOLÓGICAS".

Esta Memoria consta de nueve hojas foliadas y mecanografiadas por un solo lado de sus caras.

Madrid, 11 de Julio de 1973

N/