



ESPAÑA

(10) ES	(11) NÚMERO 436.168	(10) A 1
(12) FECHA DE PRESENTACION 31-3-75		

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES: (31) NÚMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL G01N	(53) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
(24) TITULO DE LA INVENCION UN METODO DE ENSAYO PARA DETERMINAR COLCRIMETRICAMENTE LA CANTIDAD DE UN ENZIMA PRESENTE EN UN MEDIO BIOLÓGICO FEMENINO.		
(71) SOLICITANTE (S) ALZA CORPORATION.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE 950 Page Mill Road, PALO ALTO, California 94304 Estados Unidos.		
(72) INVENTOR (ES) JORGE MARTINEZ MANAUTOU; ADOLFO ROSADO GARCIA, ambos de nacionalidad mejicana.		
(73) TITULAR (ES)		
(74) REPRESENTANTE D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU		

POOR
QUALITY

1 ra de papel. En la patente estadounidense 3.406.016, la
tira de papel está impregnada con una peroxidasa y guayaco.
La tira cambia de color cuando se humedece con saliva y la
mujer se encuentra en su periodo fértil, siendo causado el
5 cambio por la presencia de peróxido en la saliva. En la pa-
tente estadounidense 3.699.005, la tira de papel está impres-
nada con fosfato de indoxilo o fosfato de 5-bromoindoxilo
y un regulador no tóxico que mantiene un pH de 10,0-10,3.
La tira cambia de color cuando se humedece con saliva si
10 la mujer se encuentra en su periodo fértil, siendo causado
el cambio de color por el mayor nivel de fosfatasa alcalina
en la saliva durante el periodo fértil. Los ensayos colorim-
étricos para medir las fosfatasas ácidas en líquidos bio-
lógicos son conocidos por la patente estadounidense número
15 3.595.756.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La invención se basa en el descubrimiento de que la
cantidad de N-acetil- β -glucosaminidasa en los humores bio-
lógicos femeninos constituye un indicio de fertilidad y em-
20 barazo o de la ausencia del mismo. Específicamente, se ha
descubierto que se produce un brusco aumento en la cantidad
de N-acetil- β -glucosaminidasa en dichos humores durante el
periodo fértil del ciclo menstrual y que el embarazo va aso-
ciado a una disminución de la cantidad de N-acetil- β -gluco-
25 saminidasa durante un periodo de tiempo particular del ci-
clo menstrual normal.

La invención proporciona un dispositivo de ensayo pa-
ra determinar colorimétricamente la cantidad de un enzima
presente en un medio biológico femenino, siendo dicha can-
30 tidad un indicio de fertilidad o embarazo, que comprende

1 un material absorbente que contiene un regulador del pH y
un compuesto que reacciona en presencia de dicho enzima al
pH mantenido por dicho regulador para formar un producto
de reacción que tiene un color preciso a un pH predetermina
5 do, caracterizado porque el regulador mantiene un pH ácido,
preferiblemente entre 4 y 5 y el compuesto es una N-acetil-
β-d-glucosaminida.

La invención también proporciona un método de ensa-
yo para determinar colorimétricamente la cantidad de un en-
zima presente en un medio biológico femenino, siendo dicha
10 cantidad indicio de fertilidad o embarazo, cuyo método con-
siste en poner en contacto el medio con un compuesto que
reacciona en presencia de dicho enzima a un pH particular
para formar un producto de reacción que tiene un color pre-
15 ciso a un pH predeterminado y después de que se ha formado
dicho producto de reacción, establecer dicho pH predetermi-
nado, caracterizado porque el compuesto es una N-acetil-β-
d-glucosaminida y el pH particular es un pH ácido, preferi-
blemente entre 4 y 5.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

En los dibujos:

La Figura 1 es un gráfico que ilustra la variación
de la actividad (cantidad) de N-acetil-β-glucosaminidasa en
la saliva de una mujer durante una parte del ciclo menstrual;

25 Las Figuras 2 y 3 son gráficos que ilustran las varia-
ciones en las actividades (cantidades) de fosfatasa alcali-
na y fosfatasa ácida, respectivamente, en la saliva de una
mujer durante una parte del ciclo menstrual. Estas variacio-
nes de fosfatasa alcalina constituyen la base de la patente
30 estadounidense nº 3.699.005; y

1 La Figura 4 ilustra la correlación entre las cantida-
des de N-acetil- β -glucosaminidasa en la saliva de una mujer
si ésta no está embarazada y las cantidades de la misma si
se ha producido el embarazo, durante un periodo particular
5 del ciclo menstrual normal.

En cada una de las Figuras 1 a 3, los resultados han
sido normalizados adjudicando un valor de 100 a la activi-
dad enzimática máxima durante el ciclo menstrual. La flecha
a través de cero (0) indica el principio de la menstruación.

10 DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

El método de la invención implica el análisis colorimétrico de un humor biológico, como saliva, humor vaginal o humor cervical, para detectar la presencia de N-acetil- β -glucosaminidasa, con una N-acetil- β -d-glucosaminida que reacciona en presencia de dicha glucosaminidasa a un pH ácido para formar un producto de reacción que tiene un color preciso a un pH predeterminado, normalmente un pH alcalino.

15 Estas glucosaminidas son derivados de N-acetil- β -d-glucosamina que llevan un sustituyente que es eliminado en la reacción y transformado en dicho producto de reacción. Preferiblemente, la glucosaminida es un derivado fenólico incoloro o prácticamente incoloro de N-acetil- β -d-glucosamina que reacciona en presencia de dicha glucosaminidasa a un pH ácido para formar un fenol que tiene un color preciso a un pH alcalino. En la mayoría de los casos, la reacción se produce a un pH ácido de 4-5 y el color preciso aparece a un pH alcalino de 8-11, habitualmente 9-11. En el sentido utilizado aquí, el término "fenol" se refiere en general a hidróxidos de arilo en lugar de referirse específicamente a hidroxibenceno. Son ejemplos de estos derivados fenólicos la p-ni-

20

25

30

1 p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida, 1-(p-nitrocatecol)-N-acetil- β -D-glucosaminida, 2-(p-nitrocatecol)-N-acetil- β -D-glucosaminida, 3,3-bis(p-hidroxifenil)ftalido-N-acetil- β -D-glucosaminida, 3-amino-4-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida,
5 2-metil-4-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida, 3-metil-4-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida, 3-nitro-2,4,6-trimetilfenil-N-acetil- β -D-glucosaminida, 2-acetilamino-4-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida, 3-nitro-4-metoxifenil-N-acetil- β -D-glucosaminida, 3-nitro-4-acetilfenil-N-acetil- β -D-glucosaminida, 3-nitro-4-metilfenil-N-acetil- β -D-glucosaminida,
10 2-metoxi-4-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida, m-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida, 2,4-dinitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida, 2,6-dinitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida, 2,5-dinitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida, o-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida y 2-amino-4-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida. La cantidad de glucosaminida empleada en el método y en el artilugio debe ser suficiente para permitir la formación de la cantidad máxima de dicho producto de reacción que es posible con la cantidad de glucosaminidasa presente en la muestra que está siendo analizada, durante el período de incubación (reacción) dado. Estas cantidades son eficaces para producir una respuesta máxima de color a partir de la cantidad de glucosaminidasa presente en la muestra, siendo la intensidad del color una medida de la cantidad.

25 El método puede ser puesto en práctica en solución, mezclando primero una muestra de un humor femenino, tal como 0,1 ml de saliva, con 0,1 ml de p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida 0,1M disuelta en solución reguladora de citrato sódico-ácido cítrico 0,1M y 0,2 ml de solución reguladora de citrato sódico 0,1M, pH 4,5. Después de sacudir hasta que
30

1 los reactivos se han mezclado, se dejan los reactivos en
incubación durante 30 minutos a la temperatura ambiente, pa-
ra permitir que la N-acetil- β -glucosaminidasa presente en
la saliva actúe hidrolíticamente sobre la p-nitrofenil-N-
5 acetil- β -d-glucosaminida para separar el grupo p-nitrofeni-
lo de la misma y formar p-nitrofenol. Al final del periodo
de incubación, se añade a la mezcla de reacción un segundo
regulador constituido por 1,0 ml de regulador de glicinato
sódico 1,0M, pH 10,3, para interrumpir la actividad hidro-
10 lítica y desarrollar el color amarillo característico del
p-nitrofenol a pH alcalino. La absorbancia de la mezcla de
reacción se mide a 400 nm y se compara con una curva de ab-
sorbancia patrón preparada con soluciones de concentracio-
nes conocidas de p-nitrofenol a pH 10,3. De forma similar
15 pueden utilizarse en este método otros derivados fenólicos
de la N-acetil- β -d-glucosamina. Por ejemplo, puede utilizar-
se 3,3-bis(p-hidroxifenil)ftalido-N-acetil- β -d-glucosamini-
da 0,1M en lugar de la p-nitrofenil-N-acetil- β -d-glucosami-
nida en el ejemplo antes descrito. En ese caso, el producto
20 de reacción que se forma es la fenolftaleína.

El método también puede ser puesto en práctica utili-
zando el dispositivo de ensayo de la invención. El dispositi-
vo comprende un material absorbente que contiene una N-ace-
til- β -d-glucosaminida como la descrita anteriormente y un
25 regulador que mantiene un pH ácido. Los materiales absorben-
tes que pueden utilizarse son los capaces de retener líquid-
os por acción capilaro por cualquier otra técnica físico-
química. Estos materiales son el papel de ensayo, v.g. pa-
pel de filtro, tiras de celulosa, tiras de madera, fieltro,
30 tiras cerámicas porosas, terciopelo y tejidos. Se prefiere

1 el papel por su economía. Puede prepararse un dispositivo
de ensayo típico impregnando una tira de papel poroso con
0,1 a 0,5 ml de substrato de pH regulado, constituido por
5 p-nitrofenil-N-acetil- β -d-glucosaminida 0,1M disuelta en
regulador de citrato sódico 0,1M, pH 4-5. Después la tira
se seca a temperaturas comprendidas entre la ambiente y
100 °C (sin carbonizar) para evaporar el disolvente acuoso
y dejar la glucosaminida y el regulador sobre el papel.

10 El dispositivo de ensayo así preparado puede ser uti-
lizado para detectar el periodo fértil como sigue. La mujer
toca el dispositivo con su lengua o humedece de alguna otra
forma el dispositivo con su saliva y después espera alrede-
dor de 20 a 40 minutos, habitualmente 30 minutos, a la tem-
peratura ambiente, para que se forme el producto de reacción
15 fenólico sobre la porción humedecida de la tira. Después pue-
de desarrollarse el color del fenol humedeciendo la tira con
una pequeña cantidad de regulador de glicinato sódico 0,1M,
pH 9-11. Después la tira se compara con un gráfico de color
patrón que lleva una serie de manchas coloreadas desarrol-
20 das de forma similar a partir de concentraciones conocidas
de p-nitrofenol a pH 9-11. El dispositivo de ensayo desarro-
llará un color máximo durante el periodo de ovulación y fer-
tilidad de la mujer y experimentará un cambio de color míni-
mo o nulo en otros momentos. En relación con la Figura 1, el
25 dispositivo de ensayo debe presentar un cambio de color pre-
ciso en el periodo que se extiende desde unos 18 a unos 11
días antes de la menstruación en respuesta al brusco aumento
ilustrado de la actividad de glucosaminidasa durante ese pe-
riodo. La mujer puede ser sexualmente activa o inactiva du-
30 rante ese periodo de acuerdo con su deseo de quedarse emba-

1 razada.

5 La sensibilidad del método de la invención en relación con los métodos basados en un aumento de la actividad de fosfatasa es ilustrada comparando la Figura 1 con las Figuras 2 y 3. Los resultados experimentales mostrados en las Figuras 2 y 3 son determinados como sigue. Se realiza el ensayo de la fosfatasa alcalina preparando primero un regulador de glicinato sódico o potásico 0,1M ajustado a pH 9,6 y un sustrato de pH regulado constituido por fosfato de p-nitrofenilo 0,1M disuelto en regulador de glicina 0,1M, pH 9,6. El ensayo se realiza añadiendo 1,0 ml de la mezcla sustrato regulada a 0,2 ml de saliva, sacudiendo e incubando durante 45 minutos a 37°C. Transcurrido este periodo de tiempo, se mide el color desarrollado a 400 nm y se compara con una curva patrón del color del p-nitrofenol. El ensayo con fosfatasa ácida se lleva a cabo preparando primero una solución reguladora de ácido acético/acetato sódico 0,1M ajustada a pH 4,7, un sustrato de pH regulado constituido por la sal disódica de fosfato de p-nitrofenilo 0,1M disuelta en regulador de acetato sódico 0,1M ajustado a pH 4,7 y finalmente un regulador de glicina alcalina sódica 1,0M ajustado a pH 10,3. El ensayo consiste en añadir 0,1 ml del sustrato de pH regulado y 0,2 ml del regulador ácido/acetato a 0,1 ml de saliva, sacudiendo después e incubando durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Transcurrido este periodo, se añaden a la mezcla de reacción 1,0 ml de regulador de glicina y se mide la absorbancia de la mezcla a 400 nm, comparándola con una curva patrón del color del p-nitrofenol.. Como muestran las Figuras 1-3, el nivel básico de actividad de glucosaminidasa es habitualmente muy in-

10

15

20

25

30

1 ferior al 50 % mientras que los niveles básicos de activida-
des de fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina son habitualmen-
te superiores al 50 %. Esto significa que los aumentos de
la actividad de fosfatasa asociados con la fertilidad gene-
5 ralmente no son tan grandes como el correspondiente aumento
de la actividad de glucosaminidasa y que el cambio de color
causado por los primeros puede no ser tan preciso como el
cambio de color causado por el último. Asimismo, en el en-
sayo con fosfatasa alcalina la actividad aumentada cubre un
10 periodo de tiempo mayor que la actividad aumentada de glu-
cosaminidasa, indicando que el ensayo con fosfatasa puede
no ser tan preciso como el ensayo con glucosaminidasa.

15 Como describe la Figura 1, se produce un segundo aumen-
to, más pequeño, en la actividad de glucosaminidasa que se
produce en los pocos días que preceden al comienzo de la
menstruación. La Figura 1 es una ilustración ampliada de
ese segundo aumento y el efecto del embarazo sobre el mismo,
determinado sometiendo a ensayo 40 mujeres no embarazadas y
8 mujeres embarazadas, de acuerdo con la invención. La acti-
20 vidad de glucosaminidasa viene dada como la densidad ópti-
ca normalizada de las soluciones de ensayo, determinada por
sus absorbancias a 400 nm. La flecha a través de cero (0),
indica el primer día de la menstruación para las mujeres no
embarazadas y el día en que normalmente cabe esperar la
25 menstruación en ausencia de embarazo para las mujeres emba-
razadas. El área rayada verticalmente es el intervalo de
densidades ópticas exhibido por las mujeres no embarazadas.
El área rayada horizontalmente es el intervalo de densidades
ópticas exhibido por las mujeres embarazadas. Como puede
30 verse, el embarazo elimina prácticamente el segundo aumento

1 de actividad de glucosaminidasa y generalmente va asociado
con una actividad reducida durante el periodo de ensayo.
Por consiguiente, si un ensayo de una mujer hipotética cae
5 en el área que está rayada sólo horizontalmente, es proba-
ble que esté embarazada. Si cae en el área que está rayada
horizontal y verticalmente, el ensayo no es concluyente. Y
si cae en el área que está rayada solo verticalmente, pro-
bablemente no está embarazada.

10 Las modificaciones del método y del dispositivo de
la invención descritos que se encuentran dentro del alcan-
ce de la técnica química, farmacéutica y/o médica se consi-
deran dentro de los límites de esta invención.

En resumen, la Patente de invención que se solicita
deberá recaer sobre las siguientes:

15 REIVINDICACIONES

1. Un método de ensayo para determinar colorimétri-
camente la cantidad de un enzima presente en un medio bio-
lógico femenino, siendo dicha cantidad indicio de fertili-
dad o embarazo, cuyo método consiste en poner en contacto
20 el medio con un compuesto que reacciona en presencia de
dicha cantidad a un pH particular para formar un producto
de reacción que tiene un color preciso a un pH predetermi-
nado y, después de haberse formado dicho producto de reac-
ción, establecer dicho pH predeterminado, caracterizado por-
25 que el compuesto es una N-acetil- β -D-glucosaminida y el pH
particular es un pH ácido.

2. El método de ensayo de la Reivindicación 1, ca-
racterizado porque el pH ácido está comprendido entre 4 y 5.

3. El método de ensayo de las Reivindicaciones 1 o 2,
30 caracterizado porque el pH predeterminado es un pH alcalino.

1 4. El método de ensayo de las Reivindicaciones 1 a
3 caracterizado porque el pH predeterminado está compren-
dido entre 8 a 11.

5 5. El método de ensayo de las Reivindicaciones 3 o
4, caracterizado porque la N-acetil- β -d-glucosaminida es un
derivado fenólico de N-acetil- β -d-glucosamina que forma un
fenol a dicho pH ácido y tiene un color preciso a dicho pH
alcalino.

10 6. El método de ensayo de las Reivindicaciones 3 a
5 caracterizado porque la N-acetil- β -d-glucosaminida es p-
nitrofenil-N-acetil- β -d-glucosaminida o 3,3-bis(p-hidroxi-
fenil)ftalido-N-acetil- β -d-glucosaminida.

15 7. El método de ensayo de las Reivindicaciones 1 a
6, caracterizado porque el medio es saliva.

8. El método de ensayo de las Reivindicaciones 2 a
7, caracterizado porque el pH comprendido entre 4 y 5 se
mantiene regulando el medio con un regulador constituido
por citrato sódico y ácido cítrico.

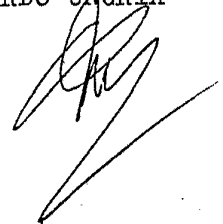
20 9. El método de ensayo de las reivindicaciones 4 a
8, caracterizado porque el pH se eleva hasta 8-11 mediante
un regulador de glicinato sódico.

25 10. El método de ensayo de las Reivindicaciones 1 a
9, caracterizado porque el medio se pone en contacto con
la N-acetil- β -d-glucosaminida a dicho pH ácido durante un
período de incubación comprendido entre 20 y 40 minutos.

30 11. Se reivindica por último como objeto sobre el
que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
UN METODO DE ENSAYO PARA DETERMINAR COLORIMETRICAMENTE LA
CANTIDAD DE UN ENZIMA PRESENTE EN UN MEDIO BIOLÓGICO FEME-
NINO.

1 Todo. conforme queda descrito y reivindicado en la
presente memoria descriptiva que consta de trece páginas
mecanografiadas y dibujos que se acompañan.

5 Madrid 31 de marzo de 1975
 BERNARDO UNGRIA
 p.p.



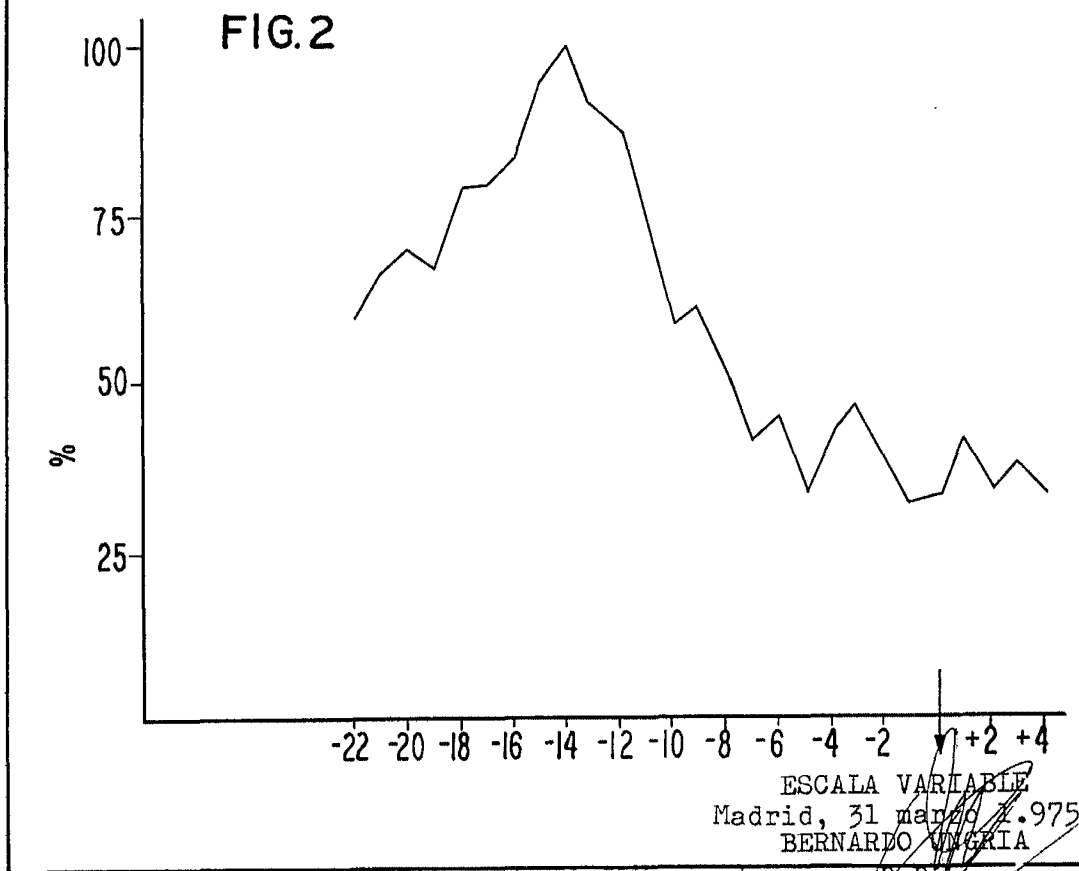
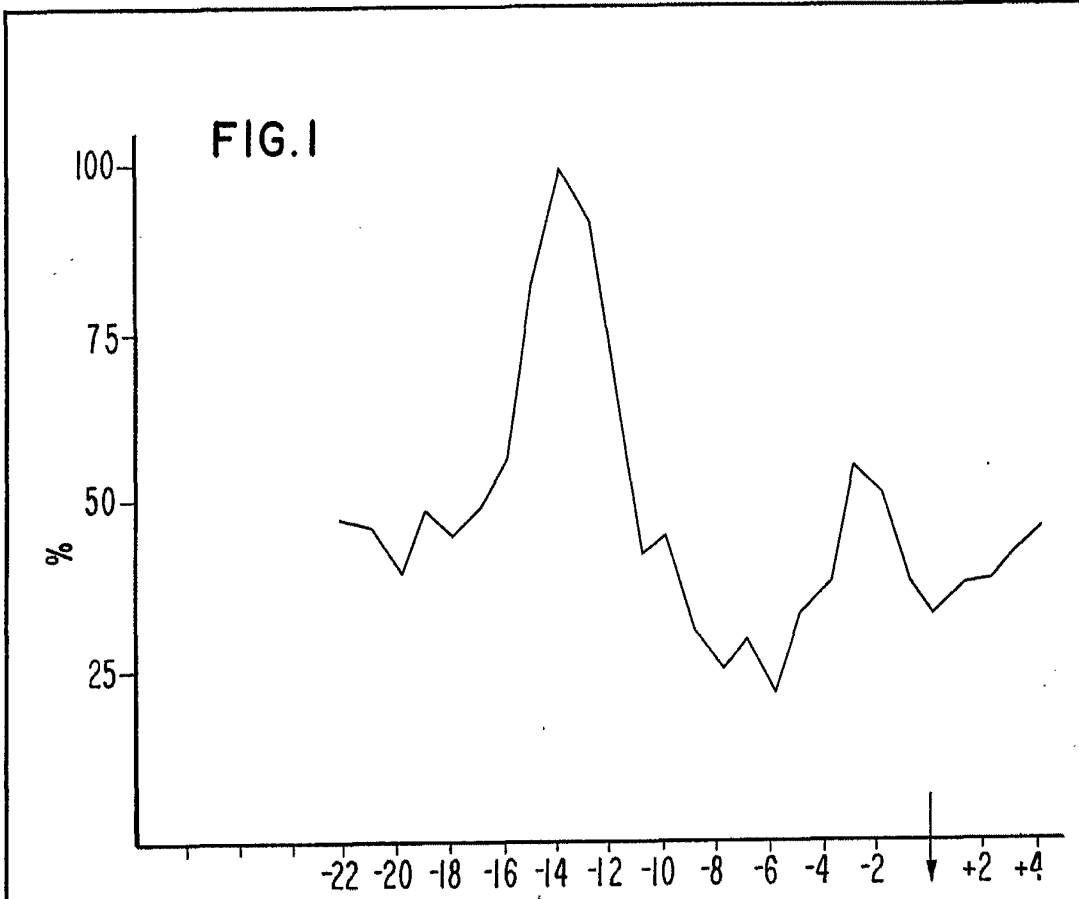
10

15

20

25

30



ESCALA VARIABLE
Madrid, 31 marzo 1975
BERNARDO VIGERIA
P.P.

