

CONFIDENTIAL

438405

-4 OCT. 1976

MEMORIA DESCRIPTIVA  
de una Patente de Invención a nombre de:  
Early Warning Company, de nacionalidad  
estadounidense, domiciliada en 425 Park  
Avenue, New York, New York 10022, --  
( U.S.A.); por: "PROCEDIMIENTO PARA LA  
PREPARACION DE PLATINAS PARA LA DETERMI-  
NACION DE ANTIGENOS Y ANTICUERPOS, PARTI-  
CULARMENTE EN FLUIDOS CORPORALES HUMANOS".

Int. Cl.<sup>2</sup>: A 61 B  
---0000000000---

5

La técnica anterior ha descrito un gran número de métodos y materiales para utilizarse en la determinación de la -- presencia de antígenos y anticuerpos, particularmente en fluidos corporales humanos. Un método principal actualmente utilizado -- implica análisis por radioinmunización y el método, en sus diver- sas formas, es extremadamente útil para la determinación exacta de la presencia de un antígeno o de un anticuerpo. No obstante, dicho procedimiento se debe llevar a cabo en un laboratorio bien equipado y, por lo tanto, no está adaptado para utilizarse en --

la consulta de un médico o por un individuo que desea efectuar la necesaria determinación.

5 Con el fin de superar y orillar las desventajas del método de análisis por radioinmunización, particularmente debido a que el método no es susceptible de utilizarse por personal no adiestrado o en laboratorios no equipados de modo completo, se han desarrollado otros diversos métodos, incluyendo un método colorimétrico. Sin embargo, incluso los métodos colorimétricos desarrollados hasta la fecha requieren una cantidad excesiva de equipo ya que implican, después de formación de una cantidad conocida de uno de los componentes de los miembros de reacción de antígeno-anticuerpo a una forma en el que éste puede ser utilizado en el procedimiento de ensayo, y la formación de un complejo del otro componente a una cierta forma líquida, implican la utilización de las diversas técnicas de laboratorio que generalmente exigen, si bien no el equipo de laboratorio más complicadamente complicado, un equipo de laboratorio que no es asequible para cualquier doctor, y ciertamente, tampoco lo es para cualquier individuo particular. Por ejemplo, aunque se ha mostrado un método colorimétrico para este tipo de procedimientos en la memoria de la patente de los Estados Unidos 3.654.090, de Schuurs y otros, según el cual se forman el componente de antígeno y el componente de anticuerpo, y éstos son mezclados con un fluido en el que se ha de determinar la presencia o ausencia de uno de los componentes, se necesita de una centrifugación complicada y elaborada.

De acuerdo con el presente invento, se ha desarrollado un artículo que puede ser empleado con facilidad en la consulta

de un médico para determinar la presencia o la ausencia de antígenos o anticuerpos en fluidos corporales y que, en realidad, puede ser empleado con igual simplicidad por un individuo que desee efectuar la determinación necesaria. La utilización de dicho artículo, y el método sencillo que puede ser empleado con el artículo, son extremadamente valiosos para una rápida determinación de diversos antígenos o anticuerpos en fluidos corporales humanos, tales como por ejemplo en un ensayo de embarazo.

De acuerdo con el método del presente invento, un componente del miembro de reacción de antígeno-anticuerpo es unido a una platina de ensayo mediante utilización de un material que no tiene forma de partículas y es dispersable homogéneamente sobre la platina y que, al ser aplicado, genera una superficie porosa. Luego el componente es unido a este revestimiento. El segundo componente del miembro de reacción de antígeno-anticuerpo es unido por enlaces covalentes con un material capaz de generar una reacción colorimétrica. En utilización, el segundo componente es incubado con un fluido corporal en el que se ha de efectuar una determinación en cuanto a la presencia del segundo componente, y esta mezcla anega la platina de ensayo. La ausencia de color es un signo positivo, que indica la presencia del componente en el fluido corporal, mientras que la presencia de color es negativa, indicando la ausencia de este componente en el fluido corporal.

En los dibujos anejos:

La figura 1 es una vista en planta de la platina de ensayo del presente invento; y

La figura 2 es una vista en sección a lo largo de la

línea 2-2 de la figura 1.

La parte crucial del presente invento es el artículo que ha de ser empleado en el procedimiento de determinación, a saber la platina de ensayo revestida. Por lo tanto, se describirá en primer término la formación de esta platina de ensayo. Para formar la platina de ensayo, se emplea generalmente una platina de vidrio normal. No obstante, puede utilizarse de igual manera materiales plásticos sintéticos que no reaccionen con los otros reactivos en las condiciones de reacción, tales como platinas de ensayo de poli(metacrilato de metilo). Estas platinas de ensayo son revestidas en primer término con gelatina que contiene el material que forma la superficie porosa que no tiene partículas. Entre los materiales que pueden emplearse para la formación de dicha superficie se encuentran alumbre de cromo, agar, agarosa y dextrano reticulado. Otros materiales capaces de formar dicha superficie, que son, esencialmente, insolubles en agua después de su aplicación, resultarán evidentes para los técnicos en la materia. El alumbre de cromo es el material preferido.

El revestimiento inicial de la platina de ensayo se logra formando una mezcla de la gelatina, del material formador de superficie porosa, particularmente alumbre de cromo, y de agua destilada. Si bien no son críticas las cantidades del material, éstas son generalmente de alrededor de 4 a 10 gramos de gelatina y de alrededor de 0,3 a 2,0 gramos del material formador de partículas por cada litro de agua. La mezcla es mantenida a una temperatura elevada de aproximadamente 50 a 60°C durante alrededor de 10 a 20 minutos, y los materiales insolubles -

remanentes son eliminados por filtración desde la solución. Las platinas son sumergidas en la solución resultante y son secadas al aire durante varias horas, por ejemplo durante la noche para asegurar un curado apropiado de los materiales aplicados.

5                   Después de la formación de las platinas revestidas con gelatina, en que la gelatina contiene un material que formará una superficie porosa sobre la platina el componente del -- miembro de reacción de antígeno-anticuerpo es unido a la platina en una forma insolubilizada. Antes de la aplicación del com  
10                   ponente insolubilizado, la platina previamente revestida es su mergida de nuevo en una solución de material formador de super ficie porosa con gelatina, del tipo que se acaba de describir, y es tratada luego con unas pocas gotas, por ejemplo, dos o -- tres, de un producto conjugado del componente, bien sea antige  
15                   no, bien sea anticuerpo, con una Sepharose tratada con bromuro de cianógeno. La Sepharose es un gel de agarosa del tipo de pg lisacárido combinado con hidrógeno.

                  La platina preparada de este modo es dejada secarse al aire y luego es desecada durante una hora. Puede ser utili  
20                   zada inmediatamente en el procedimiento de acuerdo con el pre sente invento, o puede ser refrigerada hasta que se requiera - su uso.

                  La platina de ensayo del presente invento preparada de este modo, está ilustrada en los dibujos anejos, en donde -  
25                   la platina subyacente 1 tiene una mancha de ensayo 2 colocada sobre ella.

                  Un método de formar el producto conjugado del antige no o del anticuerpo con la Sepharose tratada con bromuro de --

5           cianógeno consiste en incubar una cantidad de 15 gramos de la  
Sepharose tratada con bromuro de cianógeno, con aproximadamen-  
te 15 cm<sup>3</sup> del antígeno o anticuerpo, estando este último en --  
una concentración de 10 mg/ml, disuelto en una solución tamponada con bicarbonato de sodio 0,1 M que contiene cloruro de sodio 0,5 M. La Sepharose y el antígeno o anticuerpo son incubados a 4°C durante 20 horas, y luego el producto conjugado es -  
lavado y suspendido en una solución salina tamponada con fosfato a un pH de 7,2. El producto conjugado lavado es mezclado --  
10           con un volumen igual de la solución salina con el fin de formar el material que es colocado sobre la platina revestida. En general, se aplican a las platinas aproximadamente 0,2 cm<sup>3</sup> de este material mezclado, de manera que se forme un revestimiento blanco para fines de ensayo.

15                       El único otro material que debe ser preparado con el fin de llevar a cabo el procedimiento del presente invento es un producto conjugado del otro componente de la reacción de antígeno-anticuerpo con un material que sea capaz de generar una reacción de color durante el ensayo. En particular, el otro --  
20           componente de la reacción de antígeno-anticuerpo puede ser conjugado con una enzima que reaccione para proporcionar una determinación colorimétrica. Una enzima preferida para tal utilización es peroxidasa. Otras enzimas útiles para este fin son -  
beta-glucuronidasa, beta-D-glucosidasa, beta-D-galactosidasa, ureasa, glucosa-oxidasa más peroxidasa, y galactosa-oxidasa más  
25           peroxidasa. Dichos materiales están descritos, y se indica un método de formación, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos 3.654.090 a que arriba se ha hecho referencia.

El producto conjugado al que se acabá de hacer referencia es formado añadiendo 12 mg de la enzima, particularmente peroxidasa, a 1 ml de una solución tamponada con fosfato 0,1 M a un pH de 6,8, que contiene 5 mg del anticuerpo. A esta mezcla se añaden 0,05 ml de una solución acuosa al 1% de glutaral dehido, y la nueva mezcla es incubada durante 2 horas a la temperatura ambiente y luego es dializada frente a tampón de fosfato y solución salina. El producto conjugado de anticuerpo es luego precipitado con sulfato de amonio semisaturado para separar el producto conjugado de cualquier cantidad de peroxidasa libre remanente. Con el fin de hacer al producto conjugado resultante útil en el procedimiento del presente invento, éste es sometido a sucesivas diluciones para asegurar un punto final coloreado con cualquiera de los diversos agentes colorantes que puedan emplearse en el procedimiento, particularmente tal como se indica en los ejemplos que siguen. La concentración de este producto conjugado es reducida a la mitad con cada dilución hasta un momento en el que no aparezca ningún color sobre la platina de ensayo. La dilución empleada inmediatamente antes de ésta es la concentración del producto conjugado que se emplea luego en subsiguientes ensayos.

Con el fin de emplear el procedimiento y el artículo del presente invento, una solución de ensayo del fluido corporal, que ha de ser ensayado en cuanto a la presencia de antígenos o anticuerpos, es mezclada con el componente copulado con el material que generará una reacción de color, particularmente una de las enzimas que arriba se han mencionado, y la mezcla es incubada durante aproximadamente 2 minutos. Luego esta mez-

cla es aplicada a una de las platinas de ensayo y después de un breve tiempo de contacto de 1 a 2 minutos, la platina de ensayo es lavada con agua destilada. Un agente colorante, susceptible de ser activado por la porción de enzima del conjugado, es aplicado luego a la platina de ensayo. Si no aparece ningún color, esto indica la presencia del componente en el fluido de ensayo corporal, indicando que este material ha reaccionado con el componente sobre la platina de ensayo. Si aparece un color cuando el reactivo es colocado sobre la platina de ensayo en esta última operación, éste indica una ausencia del componente en el fluido de ensayo corporal, ya que muestra una reacción del producto conjugado con el componente de la platina de ensayo y, por lo tanto, la copulación de la enzima que genera el calor.

El agente colorante empleado en los ejemplos que siguen es uno formado a base de 4-cloro-1-naftol. Es formado añadiendo 0,5 ml de una solución de 4-cloro-1-naftol (0,5 g disueltos en 25 ml de dietilenglicol) a 2,5 ml de ácido acético al 7% en agua y 13 ml de dietilenglicol. A esta solución se añaden 0,2 ml de peróxido de hidrógeno al 3% en agua. El procedimiento que se acaba de describir forma una útil solución de color de 4-cloro-1-naftol, pero resultarán evidentes para los técnicos en la materia otras soluciones colorantes formadas por medios similares.

Con el fin de que los técnicos en la materia puedan ser más capaces de practicar el procedimiento del presente invento, y de emplear el artículo, se dan los siguientes ejemplos. Estos ejemplos deberán ser considerados como ilustrativos del

presente invento y como no limitativos del alcance del mismo -  
de ninguna manera.

EJEMPLO I.

5 Una platina de ensayo fue revestida con una solución  
de gelatina que contenía alumbre de cromo de la manera que se  
indica arriba y fue dejada secarse al aire durante la noche. -  
La platina fue revestida de nuevo en una solución similar y 3  
gotas de un producto conjugado con Sepharose de albúmina de sue  
ro de bovino (ASB), formado de la manera antes descrita, se --  
10 aplicaron a una mancha central sobre la platina. El artículo -  
resultante fué secado al aire a la temperatura ambiente.

EJEMPLO II.

Un segundo artículo fué formado de la misma manera -  
que se indica en el Ejemplo I, pero empleando 2 gotas de una so  
lución de gamma-globulina humana (GGH). Este artículo, asimismo,  
15 fué dejado secar al aire a la temperatura ambiente.

EJEMPLO III.

Se preparó una tercera platina de ensayo empleando -  
el mismo procedimiento del Ejemplo I, con gonadotropina coriú  
nica humana (GCH).  
20

EJEMPLO IV.

Dos gotas de un antisuero conjugado con peroxidasa -  
monoespecífico, dirigido contra ASB, son aplicadas a una de las  
platinas de ensayo formadas de acuerdo con el Ejemplo I. La --  
25 platina de ensayo tratada de este modo es dejada incubar a la  
temperatura ambiente durante 2 minutos y luego es lavada con -  
agua destilada. Luego, una cantidad del reactivo colorante de  
4-cloro-1-naftol, formado tal como antes se ha descrito (en lo

que sigue denominado como el reactivo colorante), es aplicada a la porción central de la platina de ensayo, y lo que originalmente había sido una mancha blanca desarrolla un halo azul purpúreo de intensidad moderada, indicando mediante el desarrollo del color por peroxidasa, la reacción del anticuerpo en la solución de peroxidasa con el antígeno sobre la platina de ensayo.

5

EJEMPLO V.

Una cantidad de 0,2 cm<sup>3</sup> de una solución del producto conjugado del Ejemplo IV es incubada durante 2 minutos con 0,2 cm<sup>3</sup> de un fluido corporal para la detección de la presencia del antígeno para ASB en el fluido corporal. Aproximadamente 2 gotas de esta mezcla son aplicadas a una platina de ensayo formada de acuerdo con el Ejemplo I. El halo azul purpúreo se desarrolló sobre las platinas de ensayo en donde no estaba presente antígeno para ASB en el fluido corporal. En los fluidos corporales que tenían el antígeno para ASB no se desarrolló color al aplicar el reactivo colorante.

10

15

EJEMPLO VI.

De una manera similar a la indicada en el Ejemplo IV, un antisuero conjugado con peroxidasa monoespecífico, dirigido contra GGH, fué aplicado a una platina de ensayo producida de acuerdo con el Ejemplo II. Al efectuar aplicación del reactivo colorante se desarrolló un halo azul purpúreo.

20

EJEMPLO VII.

De una manera similar a la indicada en el Ejemplo V, se formó una mezcla de un fluido corporal humano y el producto conjugado del Ejemplo VI con el fin de determinar la presencia del antígeno para GGH en el fluido corporal humano. De nuevo,

25

en los fluidos que contenían el antígeno, no se desarrolló color al aplicar el reactivo colorante, mientras que el halo azul purpúreo se desarrolló cuando el fluido corporal humano contenía el antígeno.

5 EJEMPLO VIII.

De una manera similar a la indicada en el Ejemplo IV se aplicó un antisuero conjugado con peroxidasa monoespecífico, dirigido contra GCH, sobre una platina de ensayo producida de acuerdo con el Ejemplo III. Después de lavar, y al efectuar --  
10 tratamiento con el reactivo colorante, se desarrolló un halo azul purpúreo en el centro de la platina de ensayo.

EJEMPLO IX.

De una manera similar a la indicada en el Ejemplo V, un fluido corporal humano fué mezclado con el producto conjugado del Ejemplo VIII y fué aplicado a una platina de ensayo formada de acuerdo con el Ejemplo III. De nuevo, la ausencia de --  
15 color al efectuarse aplicación del reactivo colorante indicó la presencia del antígeno en el fluido corporal humano, mientras que la ausencia del color indicó la presencia del antígeno en  
20 el fluido corporal humano.

Los ejemplos antes indicados eran capaces de detectar antígenos en fluidos corporales en niveles de 0,1 a 1,0 mgm/ml. Sin embargo, la sensibilidad de la platina de ensayo era tal --  
25 que se ha sido capaz de detectar niveles del antígeno muy inferiores a los del margen indicado.

Si bien los ejemplos antes indicados específicamente muestran el anticuerpo aplicado a la platina de ensayo y el antígeno conjugado con la enzima, el artículo y el procedimiento

pueden ser empleados igualmente bien con estos componentes de la reacción en disposición inversa. Similarmente, se obtienen resultados equivalentes cuando la peroxidasa es reemplazada por una de las otras enzimas y se emplea un miembro de color indicador, susceptible de ser activado por esta enzima, tal como es bien sabido en la técnica.

Si bien se han mostrado y descrito formas de realización específicas del artículo y del procedimiento de acuerdo con el presente invento, el invento no deberá ser considerado como limitado a estos ejemplos específicos, sino sólo en lo que está limitado por las siguientes reivindicaciones.

- N O T A -

Se reivindica como nuevo y de propia invención:

1.- Procedimiento para la preparación de platinas para la determinación de antígenos y anticuerpos particularmente en fluidos corporales humanos, caracterizado por comprender -- una platina de ensayo formada a base de un material inerte para los reactivos en las condiciones de reacción; a dicha platina de ensayo se la dota de un primer revestimiento formado a base de gelatina y un material, preferentemente alumbre de cromo, que al efectuar un secado, forma una superficie porosa, procediéndose seguidamente a la aplicación de un segundo revestimiento similar al anterior, es decir gelatina y un material que al efectuar el secado forma una superficie porosa, tratándose después con una pequeña cantidad de un producto conjugado de Sephrose tratada a su vez con bromuro de cianógeno y el otro componente del miembro de reacción de antígeno-anticuerpo, habiendo

se previsto que el componente conjugado con la Sepharose trata-  
da con bromuro de cianógeno sea albúmina de suero bovino, gamma  
globulina humana, gonadotropina coriónica humana, o, indistin-  
tamente, que el componente unido con la Sepharose tratada con  
5 bromuro de cianógeno sea el antígeno.

2.- PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE PLATINAS PA-  
RA LA DETERMINACION DE ANTIGENOS Y ANTICUERPOS, PARTICULARMEN-  
TE EN FLUIDOS CORPORALES HUMANOS.

Tal como se describe y reivindica en la presente Me-  
10 moria Descriptiva que consta de trece hojas, escritas a máqui-  
na por una sola cara, y sus correspondientes dibujos.

Madrid, 10 JUN 1975  
CARLOS FERNANDEZ BANDELAS  
PP

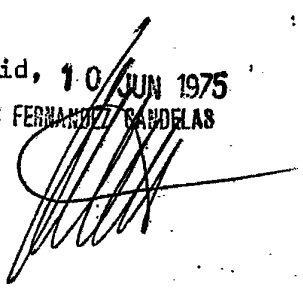


FIG. 1

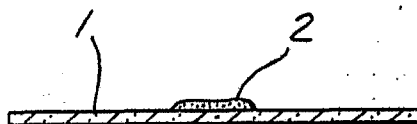
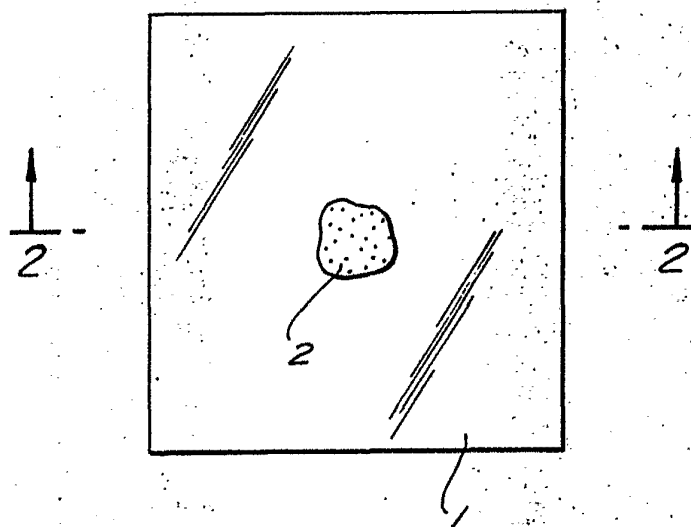


FIG. 2