

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

10 ES	11 NUMERO	10 A1
	21	
	22 FECHA DE PRESENTACION	
	439.550	

17.7.1975

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
489.224	17.7.1974	ESTADOS UNIDOS

43 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G01N	

54 TITULO DE LA INVENCION

"METODO PARA DETECTAR BAJAS CONCENTRACIONES DE ENDOTOXINA EN UNA MUESTRA DE MATERIAL"

71 SOLICITANTE (S)

Baxter Laboratories, Inc.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

DEERFIELD, ILLINOIS (Estados Unidos)

72 INVENTOR (ES)

Robert E. Hopkins, II

73 TITULAR (ES)

Baxter Laboratories, Inc.

74 REPRESENTANTE

VICTOR GIL VEGA

UNE 4.4 MOD. 3105 UTILÍZSE COMO PRIMERA PAGINA DE LA MEMORIA

CONCEDIDA

-8 OCT. 1976

**POOR
QUALITY**

Memoria Descriptiva

El registro de la patente de invención que se solicita tiene por objeto garantizar la explotación exclusiva en todo el territorio nacional y sus posesiones de un método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, conforme se describe a continuación.

Antecedentes de la invención

Como se ha tratado frecuentemente en la literatura publicada, por ejemplo, Thrombos. Diath. Hemorrhagica, Vol. 23, páginas 170-181 (1970), las células amebocitos de la sangre de miembros del género Limulus, y particularmente Limulus polyphemus, el cangrejo bayoneta, forman coágulos cuando se colocan en contacto con pirógenos tales como endotoxina bacteriana. Estas células amebocitos proporcionan a un cangrejo bayoneta lesionado: un mecanismo de coagulación de la sangre eficaz, impidiendo de éste modo una proliferación posterior y una migración de bacterias a otras partes del cuerpo.

En el momento presente, se practican en conejos ensayos con pirógenos in vivo de soluciones parenterales. Tal programa de ensayos es muy caro y difícil de realizar.

Se ha invertido una cantidad considerable en investigación en el uso de amebocitos de Limulus, después de someterlos a lisis en agua o similar para romper las células, como un medio de ensayo sustitutivo para pirógenos y productos estériles. Un resumen característico de tal trabajo reciente con Limulus se encuentra en el

Bulletin of the Parenteral Drug Association, Vol. 27,
No. 3, páginas 39-140, Mayo-Junio, 1973.

De modo característico, las células amebocitos del Limulus se someten a una lisis colocándolas en agua destilada, o mediante cualquier otro medio para romper las células de la sangre. A continuación de esto, la solución resultante se filtra y centrifuga, para eliminar los sólidos, tales como fragmentos de tejidos celulares y similares, y obtener así una solución de proteína, comúnmente conocida como lisato de Limulus. Esta solución de proteína (lisato de Limulus) se utiliza convencionalmente para detectar endotoxina bacteriana poniéndola en contacto con el material que se ensaya y observando si se forma o no un coágulo de proteína que tenga ciertos patrones mínimos de estabilidad.

Un patrón de ensayo típico de estabilidad del coágulo es invertir 180° el tubo de ensayo en el que se formó el coágulo. Si el coágulo permanece intacto, se considera como reacción de endotoxina positiva. Si el coágulo se rompe, o ni siquiera se forma un coágulo completo, se considera como reacción de endotoxina negativa.

El lisato de Limulus puro en agua estéril tiende a tener un grado inferior de sensibilidad a la presencia de endotoxina (no inferior a 1,56 nanogramos de endotoxina por ml) que la sensibilidad del ensayo con conejo U.S.P. para grandes cantidades de soluciones parenterales (por debajo de 0,097 nanogramos de endotoxina por ml) y de éste modo normalmente no es adecuado para realizar ensayos con pirógenos en tales soluciones. Si bien se han provisto anteriormente ciertos aditivos para la solución

de lisato de Limulus con el fin de mejorar la estabilidad del lisato y similares, (E. Thye Yin, y otros, Biochem Biophys. Acta, 261 (1972), páginas 284-289), no hay información de ninguna técnica anterior que permita que la sensibilidad del lisato de Limulus llegue a ser igual a la del ensayo del conejo U.S.P. para grandes cantidades de soluciones parenterales. Se ha añadido calcio como "potenciador", sin alcanzar la sensibilidad deseada (Marchalonis, y otros, Journal of Molecular Biology 32 (2) páginas 453-465 (1968)).

De acuerdo con esta invención, se describen varios materiales aditivos que aumentan la sensibilidad del lisato de Limulus, frecuentemente a un nivel que iguala y aún puede exceder la sensibilidad a la endotoxina que se puede conseguir con el ensayo del conejo U.S.P. para soluciones parenterales en grandes cantidades. La capacidad de la solución de lisato de Limulus de precipitar en presencia de concentraciones extremadamente bajas de endotoxina se consigue dotando a la solución de una concentración catalítica de uno o más de los ingredientes siguientes: imidazol, iones de manganeso, reactivo de Cleland y otros compuestos disulfhidrúlicos orgánicos equivalentes, iones estroncio, iones bario, cisteína y otros compuestos monosulfhidrúlicos orgánicos equivalentes, o iones litio.

En general es preferible con relación a los materiales especificados anteriormente que estén presentes en la solución de lisato de Limulus en las concentraciones que siguen, expresadas en moles por litro de solución de lisato.

	Imidazol (comercialmente disponible por Eastman Kodak Co.)	de 0,004 a 0,4 moles por litro y preferentemente de 0,01 a 0,3 moles por litro.
	Manganeso	preferentemente en forma de Mn^{++} , de 0,005 a 0,1 moles por litro y preferentemente de 0,01 a 0,04 moles por litro.
5	Reactivo de Cleland (comercialmente disponible por Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri)	de 0,00005 a 0,0005 moles por litro y preferentemente de 0,0001 a 0,0003 moles por litro.
	Iones estroncio (Sr^{++})	por lo general de 0,005 a 0,4 moles por litro y preferentemente de 0,01 a 0,3 moles por litro.
10	Iones bario (Ba^{++})	por lo general de 0,005 a 0,3 moles por litro, y preferentemente en presencia del tampón "Tris" bien conocido para obtener un pH de 7 a 10.
	Cisteína	por lo general de 0,005 a 0,5 moles por litro
15	Iones litio (Li^+)	por lo general de 0,005 a 0,3 moles por litro y preferentemente de 0,03 a 0,15 moles por litro.

Los iones de magnesio proporcionan por sí mismos una excelente sensibilización de la proteína de Limulus si están en presencia de no más de 0,1 moles por litro de iones sodio, que tienden a actuar como eliminadores del efecto catalítico del magnesio y por lo general tienden a suprimir la sensibilidad de la proteína del lisato a la endotoxina, incluso en presencia de otros catalizadores.

Preferentemente han de estar presentes de 0,05 a 0,3 moles de iones Mg^{++} por litro de solución. También es preferible evitar el uso de hidroxialquilaminas junto con los iones magnesio. En el artículo de Thye Yin anteriormente citado, se ha utilizado el tampón "Tris", que es una hidroxilamina, junto con iones magnesio en presencia de una concentración

de iones sodio de aproximadamente 0,15 moles. Estos dos materiales pueden eliminar el excelente efecto catalítico de los iones magnesio.

5 Preferentemente, el catalizador imidazol de esta invención se utiliza en la solución de lisato de Limulus conjuntamente con iones Li^+ , iones Mg^{++} , iones [Tioglicolato]^- (que se pueden añadir en forma de un tioglicolato de metal alcalino, tal como tioglicolato sódico), o iones Sr^{++} . Las combinaciones de estos iones con imidazol, 10 que parece actuar como un agente tamponante, proporcionan al lisato de Limulus una sensibilidad particularmente alta a la presencia de endotoxina. Por ejemplo, en unión con el intervalo de concentración de imidazol anteriormente preferido, se pueden obtener resultados excelentes y frecuentemente mejorados mediante adición de 0,005 a 0,3 moles de Li^+ por litro de solución, y preferentemente de 15 0,02 a 0,15 moles de iones Li^+ por litro de solución. De modo similar, se pueden añadir de 0,005 a 0,3 moles de iones Mg^{++} , y preferentemente de 0,01 a 0,1 moles de iones Mg^{++} por litro de solución. 20

Una combinación particularmente excelente se obtiene cuando se añaden iones imidazol y Mg^{++} en sus concentraciones anteriormente preferidas, y de igual modo se añaden iones [Tioglicolato]^- en una concentración de 0,005 25 a 0,008 moles por litro de solución. Resultados particularmente superiores se obtienen normalmente cuando están presentes de 0,02 a 0,03 moles de iones Mg^{++} ; de 0,02 a 0,03 moles de imidazol; y de 0,001 a 0,002 moles de iones [Tioglicolato]^- por litro de solución.

30 De modo similar, se pueden combinar de 0,001

a 0,01 moles de tioglicolato con los intervalos de concentración anteriores de imidazol para mejorar los resultados. También se pueden añadir de 0,005 a 0,3 moles de iones Sr^{++} y preferentemente de 0,02 a 0,15 moles de iones Sr^{++} , por litro de solución, a una solución de imidazol para mejorar la eficacia sobre el imidazol solo.

Los iones cargados positivamente antes mencionados se pueden añadir a la solución en forma de sus respectivos cloruros, si bien no hay evidencia experimental que demuestre que el anión particular elegido es crítico de modo absoluto, excepto que se deben evitar aniones que tiendan a producir reacciones secundarias desfavorables con la proteína del lisato de Limulus, o que hagan insolubles los cationes litio, magnesio, estroncio, o similares.

El uso aquí del término "catalizador" no quiere decir que implique que los agentes de esta invención sean verdaderos catalizadores en el sentido químico estricto, según el cual los catalizadores no se consideran reactivos. En esta invención, en donde el mecanismo de la acción de estos "catalizadores" sobre el lisato de Limulus no se conoce exactamente, es posible que los materiales o agentes descritos aquí como "catalizadores" también puedan ser reactivos. Por lo tanto, los términos "catalizador" o "agente sensibilizante" se utilizan aquí para indicar una sustancia capaz de proporcionar a una solución de lisato de Limulus una capacidad mejorada (o sensibilidad) para precipitar en presencia de concentraciones extremadamente bajas de endotoxina.

También se ha encontrado que los iones manganeso, particularmente los iones Mn^{++} , son activos para po

tanciar la sensibilidad del lisato de Limulus. Los iones manganeso se añaden característicamente en forma de cloruro de manganeso, aunque como se indicó anteriormente, no se ha notado que se requiera un anión particular, aun
5 que es evidentemente necesario evitar los aniones insolubilizantes y los que ocasionan reacciones secundarias desfavorables.

El reactivo de Cleland es un material fácil de conseguir comercialmente, y que aumenta la sensibilidad del lisato de Limulus, especialmente cuando se utiliza en las concentraciones especificadas anteriormente. Se cree que otros compuestos disulfhidríficos orgánicos también pueden actuar de modo equivalentes.
10

Los iones estroncio (Sr^{++}) dan resultados particularmente excelentes, especialmente cuando se utilizan en las concentraciones señaladas anteriormente. Normalmente, se utiliza el cloruro de estroncio, pero también se pueden utilizar otros aniones, sometidos a las restricciones anteriormente descritas.
15

Los iones bario (Ba^{++}) son particularmente útiles mezclados con el tampón bien conocido "Tris", disponible comercialmente (tris [hidroximetil] aminometano) y con agentes tamponantes equivalentes, especialmente cuando el tampón está presente en una concentración que proporcione un pH de aproximadamente 7 a 10.
20
25

La cisteína, y los materiales sulfhidríficos equivalentes (es decir, otros compuestos monosulfhidríficos orgánicos tales como la glutatióna, un tioglicolato de metal alcalino, o tiouracilo) muestran una capacidad de sensibilización del lisato de Limulus, especialmente en las
30

concentraciones anteriormente indicadas. También se han obtenido resultados satisfactorios cuando el hidrocloruro de cisteina disponible en el comercio se neutraliza a un pH aproximadamente de 6 a 10 con un producto alcalino tal como hidróxido sódico, carbonato potásico, hidróxido de tetrabutilemonio o similares.

En particular, se obtienen excelentes resultados utilizando, en la solución de lisato de Limulus, de 0,02 a 0,2 por cien en peso de compuestos que contengan sulfhidrilo, tales como cisteina o una sal tioglicolato de metal alcalino, además de 0,2 a 2 por cien en peso de una sal magnésica soluble en agua, tal como cloruro de magnesio. De nuevo, el anión de la sal de magnesio no parece que sea crítico, con las excepciones descritas anteriormente. El tioglicolato sódico también es altamente adecuado como compuesto que contiene sulfhidrilo.

Los iones litio, tales como los proporcionados por el cloruro de litio o una sal de litio similar que tenga un anión soluble que no interfiera, también son eficaces para aumentar la sensibilidad del lisato de Limulus, especialmente cuando se utilizan en las concentraciones indicadas anteriormente, y cuando se utilizan mezclados con imidazol.

Los agentes catalíticos o sensibilizantes de esta invención se utilizan adecuadamente disolviéndolos primero en agua destilada en las concentraciones deseadas. Después de esto, las soluciones resultantes se pueden utilizar para reconstituir el lisato de Limulus liofilizado (secado por congelación), disolviendo el lisato de Limulus en la solución. Esta técnica es ventajosa, debido a que el

lisato de Limulus se guarda preferentemente en estado li-
filizado. Las soluciones de lisato de Limulus mejoradas
de esta invención se preparan preferentemente inmediata-
mente antes de su uso, especialmente debido a que su acre-
centada sensibilidad a la endotoxina las hace más capaces
5 de precipitar bajo la contaminación accidental que a menu-
do tiene lugar por almacenaje prolongado.

Según se utiliza aquí, el término "solución"
se aplica principalmente para referirse a una solución
10 acuosa, y en general a una solución acuosa destilada, li-
bre de pirógenos, que evita la precipitación prematura
del lisato de Limulus. Sin embargo, si se desea, se puedan
utilizar otros disolventes no acuosos tales como metanol,
etanol, isopropanol, acetona, etilenglicol, u otros disol-
15 ventos miscibles en agua, especialmente mezclados con agua.

Se presentan los siguientes ejemplos, con pro-
pósitos ilustrativos solamente, y no se han de considerar
como limitativos de la invención, que queda especificada
mas adelante, en las reivindicaciones. Los porcentajes en
20 peso expresados aquí son peso/volumen en gramos 100 cc.

Ejemplo 1

Se recogen cangrejos bayoneta del Océano Atlán-
tico (Limulus polyphemus) y se colocan en un estante para
25 encerrarlos con sus costados ventrales mirando hacia arri-
ba. La unión entre los dos primeros segmentos de los can-
grejos (el prostoma y el opistoma) se prepara limpiandola
con alcohol. A continuación se pincha la unión con la agu-
ja de toma de sangre de una bolsa convencional de sangre
30 fabricada por la Fenwal Division of Travenol Laboratories,

Inc., Morton Grove, Illinois, pero modificado de modo que el tubo de recogida de sangre sea solo de 12,7 cm de longitud (5 pulgadas). La bolsa contiene 300 ml de solución de cloruro sódico al 3 por cien (peso/volumen), que contiene 2,87 gramos de etilendiaminotetraacetato (EDTA) disueltos.

Los cangrajos bayoneta se sangran uno a uno, tantos como sea necesario hasta que hayan pasado 300 ml de sangre a la bolsa, que tiene 600 ml de capacidad. El tubo donante de sangre de 12,7 cm (5 pulgadas) se cierra cerca de la entrada a la bolsa con un sellador por calor dieléctrico (unidad de cierre por calor HEMATRON^R vendida por Fenwal División of Travenol Laboratories, Inc.). A continuación el tubo de recogida de sangre se corta cerca de la sección cerrada al calor, para extraer la aguja.

Se seleccionan dos bolsas, preparadas como se indica, y se equilibran según sea necesario con pesas, y a continuación se centrifugan en una centrifugadora Sorvall RC3 durante 7 minutos con una fuerza centrífuga de 1000 (aproximadamente 1.800 rpm) para hacer que sedimenten las células amebocitos de la sangre de Limulus. En los casos en que parece que la sangre sedimenta bien, algunas veces es suficiente aplicar solamente una fuerza centrífuga de 600 (aproximadamente 1.500 rpm.) durante siete minutos.

A continuación de la etapa de centrifugación de las células, todas las bolsas de sangre se colocan en un plano con 10° de inclinación, con el fragmento cerrado del tubo de recogida de sangre dirigido hacia abajo; entonces

ces el tubo de recogida se abre de nuevo mediante corte. El producto sobrenadante se decanta con cuidado, para dejar que las células sedimentadas permanezcan en la bolsa. A continuación de la etapa de decantación, el tubo de recogida se cierra de nuevo por calor de la forma anteriormente describe.

A continuación de esto, a uno de los dos orificios de entrada estériles (orificios de medicación) de las bolsas de sangre se le introduce una aguja de inyección, y se añaden seis partes en peso de agua destilada no pirogénica por cada parte en peso de células presentes en la jeringa, para la lisis de las células. El peso de las células se puede determinar de modo adecuado substrayendo el peso de la bolsa de sangre seca patrón del peso efectivo de la bolsa específica y las células contenidas en la misma.

Se agita el agua destilada en la bolsa de sangre, y a continuación se deja en reposo durante 24 horas a 4°C. A continuación de esto, se centrifuga la bolsa a una fuerza centrífuga de 1.000 durante siete minutos.

A continuación de esto, los contenidos de líquido de cada bolsa se pasan a través de un filtro de 170 micras (un juego de filtros de sedal Fenwal estériles, procedente de Fenwal División of Baxter Laboratories, Inc., Morton Grove, Illinois), para separarlos de los sólidos sedimentados, y se colocan en un ambiente congelante hasta que se congelan sólidamente.

A continuación la solución de lisato de Limulus se deshiele con cuidado, asegurándose de que mientras tanto la solución permanece fría (es decir por debajo de

los 20° C aproximadamente). Después de descongelarla, la solución de lisato de Limulus se prefiltra a través de un filtro adicional de 170 micras Fenwal, pasando a una botella de recogida.

5 El residuo filtrado que queda en el filtro es material indeseado que ha precipitado durante la etapa de congelación. A continuación el filtrado se filtra de nuevo de modo normal a través de otro filtro (un pre-filtro Millipore tipo AP25 que tiene un tamaño de poro
10 nominal de 1,5 micras), seguido por filtración con filtro de membrana Millipore, que tenga un tamaño de poro absoluto de 1,2 micras, y un tamaño de poro nominal menor que éste. Un tamaño de poro nominal se define como el diámetro de poro que separa por lo menos el 98 por cien de todas
15 las partículas del tamaño indicado.

Antes de usarlos, todos los filtros se lavan con 1 litro de agua no pirógena, estéril. Las últimas etapas de filtración se realizan mediante presurización de la solución de lisato contra corriente del filtro con 0,9
20 kg de presión (2 libras) aproximadamente de nitrógeno gaseoso. Alternativamente, se puede utilizar el vacío en el recipiente de recogida para facilitar la filtración.

Después de la última etapa de filtración la solución se subdivide en partes alícuotas de 2,0 ml, que
25 se colocan en ampollas o tubos de ensayo de 6 ml, que han sido perfectamente lavados con agua estéril libre de pirógenos, y despirogenadas a 245° durante 4 horas. A continuación, se cierran los tubos de ensayo adecuadamente, se congelan en una máquina de liofilización (Virtis Lyophilizer) y se deja que su contenido seque por congelación has
30

La que quede un polvo seco.

Reconstitución y preparación de la solución de lisato de Limulus de sensibilidad mejorada.

5 Una serie de tubos de ensayo preparados del modo descrito anteriormente se retransforman en una solución mediante adición de 5 ml de una de las soluciones descritas más adelante.

10 Para calibrar cada muestra de solución de lisato de Limulus así obtenida, se llevan a cabo los siguientes ensayos con cada muestra.

15 A cada una de las series de tubos de ensayo vacíos, exceptuando el primer tubo de cada serie, se añaden 0,1 ml de agua no pirógena. Al primer tubo, se le han añadido 0,2 ml de una solución de endotoxina standard E. coli (disponible en el mercado procedente de Difco Laboratories, Detroit, Michigan). La concentración de endotoxina E. coli utilizada es de 100 nanogramos de endotoxina por ml. A continuación de esto, se añaden al segundo tubo 0,1 ml de solución procedente del primer tubo; y se añaden al tercer tubo 0,1 ml de solución del segundo tubo; se continúa con éste procedimiento para obtener una serie de soluciones de ensayo sucesivas, conteniendo cada una la mitad de concentración que las soluciones de ensayo precedentes, de modo que la veintava y última solución de ensayo contenga 0,00019 nanogramos de endotoxina por ml.

25 A cada uno de los intervalos de los tubos de solución resultante, se añaden 0,1 ml de solución de lisato reconstituida descrita más adelante.

30 Las series de tubos se incuban a 37° C durante 60 minutos. A continuación se invierten todos los tubos, y

5 se observa la presencia o ausencia de un coágulo de pro-
teína intacto. La presencia de un coágulo de proteína
capaz de permanecer unido después de la inversión cuida-
dosa del tubo de ensayo es una indicación de reacción
sensible positiva de la endotoxina por el lisato.

10 Según se muestra en la tabla siguiente, la
naturaleza de la solución de reconstitución afecta de mo-
do significativo a la sensibilidad de la endotoxina del
lisato. La tabla muestra varias soluciones de reconstitu-
ción que fueron ensayadas, y cita para cada caso la solu-
ción de endotoxina más diluida capaz de producir una reac-
ción de coágulo sólido positiva por el lisato de Limulus,
después de la reconstitución en las soluciones específi-
cas citadas a continuación.

15 Para fines de comparación, un ensayo con co-
nejo U.S.P. para grandes volúmenes de soluciones parente-
rales normalmente tiene un límite de detección de 0,097
nanogramos aproximadamente de endotoxina por ml. (Solu-
ción No. 11).

20

TABLA I

	<u>Descripción de la solución de reconstitución utilizada</u>	<u>Concentración más baja de la solución de endotoxina capaz de producir una reacción de coágulo sólido positiva (nanogramos/ml)</u>	
25	0,9 por cien en peso de cloruro sódico (control)	1,56	(Solución No. 7)
	0,085 por cien en peso de L cisteína. HCl	0,39	(Solución No. 9)
	0,1 por cien en peso de L cisteína	0,195	(Solución No. 10)
	0,001 por cien en peso de reactivo de Cleland	0,39	(Solución No. 9)

30

TABLA I (Continuación)

	Descripción de la solución de reconstitución utilizada	Concentración más baja de la solución de endotoxina capaz de producir una reacción de coágulo sólido positiva (nanogramo/ml)	
5	0,2 por cien en peso de 2-tio-6-amino uracilo	0,195	(Solución No. 10)
	Una mezcla de volúmenes iguales de solución de cloruro de magnesio al 1 por cien en peso y L-cisteína HCl al 0,085 por cien en peso.	0,097	(Solución No. 11)
10	Una mezcla en volúmenes iguales de solución de cloruro de magnesio al 1 por cien en peso y de L-cisteína al 0,1 por cien en peso	0,097	(Solución No. 11)
	Una mezcla de volúmenes iguales de solución al 1 por cien en peso de cloruro de magnesio y solución de tioglicolato sódico al 0,1 por cien en peso.	0,097	(Solución No. 11) y algunas veces
15		0,048	(Solución No. 12)
	Una mezcla en la relación de volúmenes de 3:2 de solución de cloruro magnésico al 1 por cien en peso y solución de tioglicolato sódico al 0,1 por cien en peso.	0,195	(Solución No. 10)
20	Una mezcla de 2 partes en volumen de solución de cloruro magnésico al 1 por cien en peso; 1 parte en volumen de solución de cloruro cálcico al 0,9 por cien en peso, y 1 parte en volumen de L-cisteína. HCl de 0,85 por cien en peso	0,195	(Solución No. 10)
25	Una solución de volúmenes iguales de solución de sulfato magnésico al 1 por cien en peso y 2-tio-6-amino uracilo al 0,2 por cien en peso.	0,195	(Solución No. 10)
	Tioglicolato sódico al 0,1 por cien en peso	0,39	Solución No. 9)

Ejemplo 2

Otras muestras de una operación diferente de lisato de Limulus liofilizado, preparadas como en el Ejemplo 1, se reconstituyen en la forma del Ejemplo 1 con 2 ml de una solución de reconstitución consistente en 80 por cien en volumen de agua estéril y 20 por cien en volumen de tampón de imidazol 0,13 M (pH 6,8), e incluye también aditivos adicionales en las concentraciones indicadas en la Tabla II siguiente:

10

TABLA II

	<u>Descripción del aditivo adicional en la solución de reconstitución utilizada</u>	<u>Concentración más baja de la solución de endotoxina capaz de producir una reacción de coágulo sólido positiva (nanogramos/ml.)</u>
15	Agua estéril (control)-sin imidazol	3,12 (Solución No. 6) y algunas veces 1,56 (Solución No. 7)
	Sin aditivo-solamente imidazol	0,195 (Solución No. 10)
20	Cloruro de litio en una concentración de 0,1 M.	0,097 (Solución No. 11) y algunas veces 0,048 (Solución No. 12)
	Cloruro de litio en una concentración de 0,05 M.	0,097 (Solución No. 11)
	Cloruro de litio en una concentración de 0,025 M.	0,097 (Solución No. 11)
	Cloruro de litio en una concentración de 0,0125 M.	0,097 (Solución No. 11)
25	Cloruro de magnesio en una concentración de 0,2 M.	0,097 (Solución No. 11) *
	Cloruro de magnesio en una concentración de 0,1 M.	0,097 (Solución No. 11) *
	Cloruro de magnesio en una concentración de 0,05 M.	0,048 (Solución No. 12)
30	Cloruro de magnesio en una concentración de 0,025 M.	0,048 (Solución No. 12)

TABLA II (Continuación)

	<u>Descripción del aditivo adicional en la solución de reconstitución utilizada</u>	<u>Concentración más baja de la solución de endotoxina capaz de producir una reacción de coágulo sólido positiva (nanogramos/ml.)</u>
5	Cloruro de magnesio en una concentración de 0,125 M.	0,048 (Solución No. 12)
	Cloruro de magnesio en una concentración de 0,00625 M.	0,097 (Solución No. 11)*
	Cloruro de estroncio en una concentración de 0,2 M.	0,097 (Solución No. 11)**
10	Cloruro de estroncio en una concentración de 0,1 M.	0,048 (Solución No. 12)**
	Cloruro de estroncio en una concentración de 0,05 M.	0,048 (Solución No. 12)
	Cloruro de estroncio en una concentración de 0,025 M.	0,097 (Solución No. 11)
15	Cloruro de estroncio en una concentración de 0,0125 M.	0,048 (Solución No. 12)
	* La repetición de éste experimento en una solución de imidazol estéril de 0,12 M (pH 7,07) da lugar a una reacción de coágulo positiva con una concentración de endotoxina de 0,048 nanogramos/ml (Solución No. 12).	
20	** La repetición de éste experimento en una solución de imidazol estéril de aproximadamente 0,12 M (pH 7,23) da lugar a una reacción de coágulo positiva con una concentración de endotoxina de 0,025 nanogramos/ml. (Solución No. 13).	

Ejemplo 3

Otras muestras de lisato de Limulus liofilizado, preparadas como en el ejemplo I, del modo expuesto en dicho ejemplo, con 2 ml. de una solución que comprenda 0,12 M de una solución de imidazol (pH 7,04) y que incluya ingredientes adicionales en las concentraciones indicadas en la siguiente Table III:

TABLA III

	<u>Descripción de los ingredientes adicionales de la solución de reconstitución utilizada (concentración molar)</u>	<u>Concentración más baja de solución de endotoxina capaz de producir una reacción de coágulo sólido positiva (nanogramos/ml).</u>
5	Sin aditivos-solemente imidazol	0,097 (Solución No. 11)
	Tioglicolato sódico con una concentración de 0,005 M	0,048 (Solución No. 12)
	Tioglicolato sódico con una concentración de 0,025 M.	0,048 (Solución No. 12)
10	Tioglicolato sódico con una concentración de 0,00125 M.	0,048 (Solución No. 12)

Ejemplo 4

Otras muestras de lisato de Limulus liofilizado, preparadas como en el Ejemplo 1, se reconstituyen en la forma del Ejemplo 1 con 2 ml de distintas soluciones de reconstitución según se describe más adelante. La sensibilidad a la endotoxina de los productos resultantes es como se muestra a continuación:

20

TABLA IV

	<u>Descripción de la solución de reconstitución utilizada</u>	<u>Concentración más baja de la solución de endotoxina capaz de producir una reacción de coágulo sólido positiva (nanogramos/ml).</u>
25	Agua estéril	Una concentración de 0,78 (Solución No. 8) no produce una reacción positiva.
	Cloruro de magnesio con una concentración de 0,1 M; imidazol con una concentración de 0,1 M, y tioglicolato sódico con una concentración de 0,005 M.	0,195 (Solución No. 10)

30

TABLA IV (Continuación)

	Descripción de la solución de reconstitución utilizada	Concentración más baja de la solución de endotoxina capaz de producir una reacción de coágulo sólido positiva (nanogramos/ml).
5	Cloruro de magnesio con una concentración de 0,05 M; imidazol con una concentración de 0,05 M y tioglicolato sódico con una concentración de 0,0025 M.	0,097 (Solución No. 11)
10	Cloruro de magnesio con una concentración de 0,025 M; imidazol con una concentración de 0,025 M; y tioglicolato sódico con una concentración de 0,00125 M.	0,048 (Solución No. 12)
15	Cloruro de magnesio con una concentración de 0,0125 M; imidazol con una concentración de 0,0125 M; y tioglicolato sódico con una concentración de 0,000625 M.	0,195 (Solución No. 13)
	Cloruro de magnesio con una concentración de 0,05 M; cloruro de litio con una concentración de 0,05 M; e imidazol con una concentración de 0,05 M.	0,097 (Solución No. 11)
20	Cloruro de magnesio con una concentración de 0,025 M; cloruro de litio con una concentración de 0,025 M; e imidazol con una concentración de 0,025 M.	0,097 (Solución No. 11)
25	Cloruro de magnesio con una concentración de 0,1 M; cloruro de litio con una concentración de 0,1 M; imidazol con una concentración de 0,1 M; y tioglicolato sódico con una concentración de 0,005 M.	0,097 (Solución No. 11)
30	Cloruro de magnesio con una concentración de 0,05 M; cloruro de litio con una concentración de 0,05 M; imidazol con una concentración de 0,05 M; y tioglicolato sódico con una concentración de 0,0005 M.	0,097 (Solución No. 11)

TABLA IV (Continuación)

	Descripción de la solución de reconstitución utilizada	Concentración más baja de la solución de endotoxina capaz de producir una reacción de coágulo sólido positiva (nano gramos/ml).
5	Cloruro de magnesio con una concentración de 0,025 M; cloruro de litio con una concentración de 0,025 M; imidazol con una concentración de 0,025 M; y tioglicolato sódico con una concentración de 0,00125 M.	0,097 (Solución No. 11)
10	Cloruro de litio con una concentración de 0,1 M; imidazol con una concentración de 0,1 M; y tioglicolato sódico con una concentración de 0,005 M.	0,097 (Solución No. 11)
15	Reactivo de Cleland con una concentración de 0,0005 M.	0,195 (Solución No. 12)
	Reactivo de Cleland con una concentración de 0,00025 M.	0,097 (Solución No. 11)
	Reactivo de Cleland con una concentración de 0,0000625 M.	0,195 (Solución No. 12)
20	Reactivo de Cleland con una concentración de 0,00025 M; cloruro de magnesio con una concentración de 0,05 M; y tampón "Tris" con una concentración de 0,00625 M.	0,097 (Solución No. 11)
25	Reactivo de Cleland con una concentración de 0,000125 M; tampón "Tris" con una concentración de 0,00312 M; y cloruro de magnesio con una concentración de 0,025 M.	0,097 (Solución No. 11)
	Cloruro manganoso (Mn^{++}) con una concentración de 0,05 M.	0,195 (Solución No. 12)
	Cloruro manganoso con una concentración de 0,025 M.	0,097 (Solución No. 11)
	Cloruro manganoso con una concentración de 0,0125 M.	0,097 (Solución No. 11)

TABLA IV (Continuación)

	Descripción de la solución de reconstitución utilizada	Concentración más baja de la solución de endotoxina capaz de producir una reacción de coágulo sólido positiva (nanogramos/ml).
5	Cloruro manganoso con una concentración de 0,00625 M.	0,097 (Solución No. 7.)
	Cloruro manganoso con una concentración de 0,1 M e imidazol con una concentración de 0,125 M.	0,195 (Solución No. 11)
10	Cloruro manganoso con una concentración de 0,00625 M e imidazol con una concentración de 0,125 M.	0,097 (Solución No. 11)
	Cloruro de estroncio con una concentración de 0,2 M.	0,097 (Solución No. 11)
	Cloruro de estroncio con una concentración de 0,05M.	0,097 (Solución No. 11)
15	Cloruro de estroncio con una concentración de 0,0125 M.	0,097 (Solución No. 11)
	Cloruro de estroncio con una concentración de 0,2 M en solución tampón "Tris" que tenga un pH de 9,3	0,048 (Solución No. 12)
20	Cloruro de estroncio con una concentración de 0,1 M en solución tampón "Tris" de un pH de 9,3.	0,048 (Solución No. 12)
	Cloruro de estroncio con una concentración de 0,0125 M en solución tampón "Tris" con un pH de 9,3	0,048 (Solución No. 12)
25	Solución tampón "Tris" control para el cloruro de estroncio dado (pH 9,3)	0,39 (Solución No. 9)
	Cloruro de bario con una concentración de 0,2 M.	0,195 (Solución No. 10)
	Cloruro de bario con una concentración de 0,05 M en solución tampón "Tris" que tenga un pH de 9,55.	0,097 (Solución No. 11)
30		

TABLA IV (Continuación)

	Descripción de la solución de reconstitución utilizada	Concentración más baja de la solución de endotoxina capaz de producir una reacción de coágulo sólido positiva (microgramo/ml).
5	Cloruro de bario con una concentración de 0,025 M en solución tampón "Tris" que tenga un pH de 9,55	0,097 (Solución No. 11)
10	Cloruro de bario con una concentración de 0,00625 M en solución tampón "Tris" que tenga un pH de 9,5	0,195 (Solución No. 10)
	Tampón "Tris" control para cloruro de bario citado (pH 9,55)	0,39 (Solución No. 9)
15	Cisteína, HCl con una concentración de 0,02 M, neutralizada a pH 7,15 con <u>di</u> solución de hidróxido <u>sód</u> ico 5 N.	0,195 (Solución No. 10)
	Cloruro de litio con una concentración de 0,2 M	0,195 (Solución No. 10)
	Cloruro de litio con una concentración de 0,1 M	0,097 (Solución No. 11)
20	Cloruro de litio con una concentración de 0,05 M	0,097 (Solución No. 11)
	Cloruro de litio con una concentración de 0,025 M	0,195 (Solución No. 10)
	Cloruro de litio con una concentración de 0,2 M en una solución tampón "Tris" con un pH de 9,55	0,097 (Solución No. 11)
25	Cloruro de litio con una concentración de 0,05 M en solución tampón "Tris" con un pH de 9,55	0,097 (Solución No. 11)
	Cloruro de litio con una concentración de 0,0125 M en solución tampón "Tris" de pH 9,55	0,195 (Solución No. 10)

TABLA IV (Continuación)

	Descripción de la solución de reconstitución utilizada	Concentración más baja de la solución de endotoxina capaz de producir una reacción de coágulo sólido positiva (nanogramos/ml).
5		
	Solución tampón "Tris" control para cloruro de litio citado (pH 9,55)	0,39 (Solución No. 9)
10	Cloruro de magnesio con una concentración de 0,0125 M en agua estéril, y menos de 0,1 moles por litro de iones Na ⁺	0,097 (Solución No. 11)
	Cloruro de magnesio con una concentración 0,05 M en agua estéril, y menos de 0,1 moles por litro de iones Na ⁺	0,048 (Solución No. 12)
15	Cloruro de magnesio con una concentración de 0,2 M en agua estéril, y menos de 0,1 moles por litro de iones Na ⁺	0,097 (Solución No. 11)
	Cloruro de magnesio con una concentración de 0,05 M en solución tampón "Tris" con una concentración de 0,0125 M (pH 8,10), y menos de 0,1 moles por litro de iones Na ⁺	0,097 (Solución No. 11)

20 Los términos en que se ha redactado esta memoria deberán ser tomados siempre en sentido amplio, no limitativo.

25 NOTA DE REIVINDICACIONES

30 Se reivindica como de propia y nueva invención a favor de Baxter Laboratories, Inc, con domicilio en Deerfield, Illinois 60015 (Estados Unidos), lo especificado en las siguientes reivindicaciones:

5
10
12.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, caracterizado en que comprende la puesta en contacto de dicha muestra con una solución de lisato de Limulus, en presencia de una concentración catalítica de un material seleccionado entre los del grupo constituido por imidazol, manganeso iónico, compuestos de disulfhidrilo orgánico, tales como reactivo de Cloland, estroncio iónico, bario iónico y compuestos de monosulfhidrilo orgánico, tales como la cisteína y el litio iónico.

15
23.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 1, caracterizado en que como concentración catalítica se utiliza imidazol.

15
33.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 2, caracterizado porque a dicha solución de lisato se añaden de 0,004 a 0,4 moles de imidazol por litro.

20
43.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 3, caracterizado porque a la solución de lisato se añaden de 0,01 a 0,3 moles de imidazol por litro de solución.

25
53.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 3 caracterizado porque se encuentran presentes en la solución de lisato de 0,005 a 0,3 moles de iones Li^+ por litro de solución.

30
63.- Método para detectar bajas concentra-

ciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 4 caracterizado porque se encuentran presentes en la solución de lisato de 0,02 a 0,15 moles de iones Li^+ por litro de solución.

5 7^a.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 3, caracterizado porque se encuentran presentes en la solución de lisato de 0,005 a 0,3 moles de iones Mg^{++} por litro de solución.

10 8^a.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxinas en una muestra de material, según la reivindicación 4, caracterizado porque se encuentran presentes en la solución de lisato de 0,01 a 0,1 moles de iones Mg^{++} por litro de solución.

15 9^a.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 3, caracterizado porque se encuentran presentes en la solución de lisato de 0,0005 a 0,008 moles de iones (tioglicolato)⁻ por litro de solución.

20 10^a.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 9, caracterizado porque se añaden a dicha solución los mencionados iones tioglicolato en la forma de tioglicolato sódico.

25 11^a.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 3, caracterizado porque se encuentran presentes en la solución de lisato de 0,005 a 0,3 moles de iones de Sr^{++} por litro de solución.

30. 12^a.- Método para detectar bajas concentra-

ciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 4, caracterizado porque se encuentran presentes en la solución de lisato de 0,02 a 0,15 moles de iones Sr^{++} por litro de solución.

5 139.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 8, caracterizado porque se encuentran presentes en la solución de lisato de 0,0005 a 0,008 moles de iones (tioglicolato)⁻ por litro de solución.

10 140.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 3, caracterizado porque se encuentran presentes en la solución de lisato de 0,01 a 0,2 moles de iones de Li^{+} por litro de solución.

15 152.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 14 caracterizado porque dichos iones Li^{+} se añaden en forma de cloruro de litio.

20 160.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 1, caracterizado en que como concentración catalítica se utiliza manganeso iónico.

25 170.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 1, caracterizado en que como concentración catalítica se utiliza el reactivo de Cleland.

30 180.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 1, caracterizado en que se emplean como concentraciones catalíticas iones Sr^{++} .

5 19^a.- Método para detectar bajas concentra-
ciones de endotoxina en una muestra de material, según
la reivindicación 18, caracterizado porque la solución
de lisato incluye de 0,005 a 0,4 moles de iones Sr^{++} por
litro.

10 20^a.- Método para detectar bajas concentra-
ciones de endotoxina en una muestra de material, según
la reivindicación 19, caracterizado porque se encuentran
presentes en la solución de lisato de 0,01 a 0,3 moles
de iones Sr^{++} por litro de solución.

15 21^a.- Método para detectar bajas concentra-
ciones de endotoxina en una muestra de material, según
la reivindicación 20 caracterizado porque se añaden iones
 Sr^{++} en forma de cloruro de estroncio.

22^a.- Método para detectar bajas concentra-
ciones de endotoxina en una muestra de material, según
la reivindicación 1, caracterizado en que se emplean co-
mo concentraciones catalíticas iones Ba^{++} .

20 23^a.- Método para detectar bajas concentra-
ciones de endotoxina en una muestra de material, según
la reivindicación 22 caracterizado porque la solución
de lisato contiene de 0,005 a 0,3 moles de iones Ba^{++} por
litro.

25 24^a.- Método para detectar bajas concentra-
ciones de endotoxina en una muestra de material, según
la reivindicación 23 caracterizado porque se incluye una
cantidad de tampón "Tris" suficiente para proporcionar
un pH de 7 a 10.

30 25^a.- Método para detectar bajas concentra-
ciones de endotoxina en una muestra de material, según

la reivindicación 1, caracterizado en que como concentración catalítica se emplea un compuesto de monosulfhidrilo orgánico.

5 26ª.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 25, caracterizado porque dicha solución de lisato contiene de 0,005 a 0,03 moles de cisteína por litro.

10 27ª.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 25, caracterizado porque la solución de lisato contiene una cantidad catalítica de iones de magnesio.

15 28ª.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 1, caracterizado por la utilización con dicha solución de lisato de 0,2 a 2 % en peso, de sal de magnesio soluble en agua y de 0,02 a 0,2 % en peso de un compuesto monosulfhidrilo orgánico seleccionado
20 entre el grupo formado por cisteína, sales de tioglicolato de metal alcalino, y 2-tioaminoouracil.

 29ª.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 28 caracterizado porque dicha sal de
25 magnesio es cloruro de magnesio.

 30ª.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 29 caracterizado porque dicho compuesto que contiene sulfhidrilo es tioglicolato sódico.

30 31ª.- Método para detectar bajas concentra-

ciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha solución incluye de 0,004 a 0,4 moles de imidazol, y de 0,005 a 0,3 moles de iones de Mg^{++} por litro de solución.

5

32ª.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 31 caracterizado porque se encuentran presentes en la solución de lisato de 0,01 a 0,3 moles de imidazol y de 0,01 a 0,1 moles de iones Mg^{++} por litro de solución

10

33ª.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 32 caracterizado porque se encuentran presentes en la solución de lisato de 0,0001 a 0,008 moles de iones (tioglicolato)⁻ por litro de solución.

15

34ª.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 1, caracterizado porque con dicha solución de lisato se emplean de 0,004 a 0,4 moles de imidazol, y de 0,005 a 0,3 moles de iones Sr^{++} .

20

35ª.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 34 caracterizado porque se encuentran presentes en la solución de lisato de 0,01 a 0,3 moles de imidazol, y de 0,02 a 0,15 moles de iones Sr^{++} por litro de solución.

25

36ª.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 1, caracterizado porque con dicha solu

30

ción de lisato se emplean de 0,005 a 0,3 moles de iones Ba^{++} por litro, y porque además dicha solución contiene una cantidad de tampon "Tris" suficiente para que la solución tenga un pH de 9 a 10.

5 37A.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 36, caracterizado porque dichos iones Ba^{++} se añaden a dicha solución en forma de cloruro de bario.

10 38B.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 1, caracterizado porque con dicha solución de lisato se emplea de 0,2 a 2 en peso de una sal de magnesio soluble en agua y de 0,02 a 0,2 % en peso de un compuesto que contenga sulfhidrilo, seleccionado entre el grupo formado por cisteina, sales de tioglicolato de metal alcalino y 2-tioaminoaural.

15 39A.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 38, caracterizado porque dicha sal de magnesio es cloruro de magnesio.

20 40B.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 39 caracterizado porque se encuentran presentes en la solución 0,5 % en peso aproximadamente de cloruro de magnesio y 0,05 % en peso aproximadamente de dicho compuesto que contiene sulfhidrilo.

25 41B.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 40 caracterizado porque dicho compuesto

30

que contiene sulfhidrilo es tioglicolato sódico.

5 42º.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 1, caracterizado en que como concentración catalítica se empleen iones Li^+ .

10 43º.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 42, caracterizado porque dicha solución de lisato contiene de 0,005 a 0,3 moles de iones Li^+ por litro.

15 44º.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 43 caracterizado porque encuentran presentes en la solución de 0,03 a 0,15 moles de cloruro de litio por litro de solución.

20 45º.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 1, caracterizado porque con dicha solución se utilizan de 0,004 a 0,4 moles de imidazol y de 0,005 a 0,3 moles de iones Li^+ por litro.

25 46º.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 45 caracterizado porque se encuentran presentes en la solución de 0,03 a 0,15 moles de cloruro de litio por litro de solución.

30 47º.- Método para detectar bajas concentraciones de endotoxina en una muestra de material, según la reivindicación 1, caracterizado en que como concentración catalítica se utilice magnesio iónico en presencia de no más de 0,1 mol por litro de iones de sodio.

5 488.- Método para detectar bajas concentra-
ciones de endotoxina en una muestra de material, según
la reivindicación 47 caracterizado porque se encuentran
presentes en la solución de 0,005 a 0,3 moles de iones
Mg⁺⁺ por litro de solución.

498.- "MÉTODO PARA DETECTAR BAJAS CONCENTRA
CIONES DE ENDOTOXINA EN UNA MUESTRA DE MATERIAL".

10 Tal y como se deja descrito en la memoria
precedente, que consta de treinta y tres hojas foliadas
y mecanografiadas por una sola de sus caras.

Madrid, 17 de Julio de 1975

P.A. de BAXTER LABORATORIES, INC

Victor Gil Vega

