

440969

CONCEDIDA

23 NOV. 1976

Int. Cl.: G01N

PATENTE DE INVENCION

a favor de

ISTITUTO FARMACOLOGICO SERONO Spp.A., de nacionalidad italiana,
residente en Via Casilina 125, Roma (Italia) por:
"PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION RADIOINMUNOLOGICA DE GONA-
DOTROPINA CORIONICA HUMANA EN PRESENCIA DE HORMONA LUTEINIZAN-
TE".

Memoria descriptiva

Las técnicas inmunológicas de determinación de hor-
monas se basan en la capacidad de una determinada hormona pa-
ra actuar como antígeno en una determinada reacción inmunoló-
gica.

5

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

POOR
QUALITY

les una cantidad desconocida de hormona sin radioactivar (fría) que tiene que ser determinada, se 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 conteo de radioactividad del complejo antígeno-anticuerpo por comparación con una curva estándar 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 conteo 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 invariables 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

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 em-
barazo, y descubrir y controlar el coriocarcinoma así como
35 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
40 precoz del embarazo.

Muy recientemente, Ross y atra(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;
45 M. Margoules and F. C. Greenwood Editors; publicada por Ex-
cerpta Medica (1971), han ensayado antisueros producidos con-
tra las subunidades α y β de GCH (llamadas respectivamente
a continuación GCH- α y GCH- β ,) en las reacciones radioin-
munológicas y comprobaron que el antisuero creado contra la
50 GCH- β tiene una mayor especificidad.

Por una exposición gráfica en la cual, entre otras
curvas, puedan verse dos curvas de inhibición de la reacción
radioinmunológica entre suero anti-GCH- β y GCH- β radioacti-
vada, construidas usando GCH y respectivamente NL pituitaria
55 humana, puede advertirse que las dos curvas de inhibición men-
cionadas difieren en su inclinación.

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 radiactivar (es decir, hasta aproximadamente 250-300 m U.I./ml).

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.

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 la "Segunda preparación Internacional de Referencia GCH", 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.

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.

Según la presente invención, se ha comprobado que, cuando se usa un anticuerpo 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 radioinmunitaria.

La invención proporciona, un procedimiento para la determinación radioinmunitaria de GCH en presencia de cantidades comparables de HL, en el cual un anticuerpo GCH- β absorbido con GCH- α con un sistema GCH- β radioactivado es usado para distinguir la hormona GCH de la HL. Este método es particularmente adecuado para una comprobación precoz del embarazo.

Los Ejemplos siguientes muestran que el anticuerpo de la presente invención es capaz de discriminar entre GCH y HL.

Ejemplo 1

Un anticuerpo GCH- β que había sido absorbido con GCH- β según la presente invención fue diluido al 1 - 2000 con un tampón de fosfato 0,01 M a un pH 7,5, que contenía suero normal de conejo (1:1000), tetraacetato tetrasódico de etilendiamina (0,014 M) y albúmina de suero bovino (0,25 %).

Emplicando el mismo tampón que, sin embargo, no contenía el suero de conejo, se prepararon dos series de soluciones de concentraciones gradualmente variadas, que contenían una

preparación GCH del comercio (Roussel, 3200 U.I./mg) y respectivamente una preparación urinaria de HL (100 U.I./mg).

110 Una preparación de GCH- β , que había sido radiactivada con ^{125}I de acuerdo con el método de cloramina-T descrito en Greenwood y otro(s), Biochem. J. 89, 114 (1963), fué diluida convenientemente con el mismo tampón usado para preparar las soluciones de GCH y HL anteriormente mencionadas.

115 Se incubó durante 24 horas a 37° C., con una parte alícuota de cada una de las soluciones de GCH o HL una cantidad fija de antisuero GCH- β diluido. A cada una de las mezclas de incubación, se le añadió una cantidad correspondiente a 10.000 contajes por minuto de GCH- β radiactivados. Se continuó la incubación a 37° C. durante 24 horas y se añadió suero anti-gama-globulina de conejo en una cantidad suficiente
120 para precipitar el complejo antígeno-anticuerpo formado. Después de una ulterior incubación de 24 horas a 37° C., se separó por centrifugación el precipitado de la sobrenadante tirándose este último. Por fin, se hizo el contaje de la radiactividad del precipitado.
125

Se trazó una curva de inhibición para cada una de las dos hormonas. En dichas curvas, la radiactividad del precipitado fué marcada contra la concentración de la hormona. Por la comparación entre las dos curvas así obtenidas, pudo observarse que se necesitaban 45 m U.I./ml de GCH y 523 m U.I./ml de HL respectivamente para obtener una inhibición del 50 % de la
130 reacción entre el antisuero GCH- β y GCH- β radiactivada.

135 Este Ejemplo muestra que se necesitan cantidades de HL más de 10 veces superiores a las cantidades de GCH necesarias para obtener un grado equivalente de inhibición en la reacción radioinmunológica.

Ejemplo 2

140 Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 para realizar determinaciones radioinmunológicas similares, excepto que las soluciones de GCH o HL de las mezclas de incubación fueron sustituidas con muestras de orina de mujeres en menstruación normal durante la fase luteal.

145 En ningún caso se observó un importante grado (es decir, superior al 20 % aproximadamente) de inhibición de la reacción radioinmunológica entre el antisuero GCH- β y GCH- β radiactivada.

Ejemplo 3

150 Se repitió el procedimiento descrito en el ejemplo 1 para realizar determinaciones radioinmunológicas similares, excepto que las soluciones de GCH o HL de las mezclas de incubación fueron sustituidas con muestras de orina de mujeres en la primera fase del embarazo (de 6 a 12 días después de la ovulación y el coito). Las muestras ensayadas revelaron grados de inhibición comprendidos entre el 20 y el 70 %.

155 Ejemplo 4

A una muestra de orina recogida durante la fase luteal del ciclo menstrual (nivel fisiológico de HL de 10 a 15 m

U.I./ml), se añadieron cantidades gradualmente variadas de GCH comercial.

160

En determinaciones radioinmunológicas realizadas de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, se observó un importante grado de inhibición para cantidades de GCH superiores a 20-25 m U.I./ml.

165

A una muestra de orina similar se añadieron cantidades gradualmente variadas de HL. No pudo observarse un importante grado de inhibición hasta que se añadieron cantidades de HL de cuando menos 200 m U.I./ml.

170

En el procedimiento de la presente invención puedan 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.

175

Esta patente de invención se corresponde a la depositada en Italia con el número 51 593 A/72 y tiene la prioridad de fecha 17 de julio de 1972 por acogerse a los beneficios del artículo 21 del vigente Estatuto sobre la Propiedad Industrial y del artículo 48 del Convenio de la Unión de París.

REIVINDICACIONES

180

1). Procedimiento para la determinación radioinmunológica de gonadotropina coriónica humana en presencia de hormona luteinizante, en una muestra que contiene gonadotropina coriónica humana en presencia de hasta 10 veces aproximadamente la cantidad

en m. U.I./ml de hormona luteinizante, caracterizado por apli-
carse un sistema antisuero de gonadotropina- coriónica humana,
185 absorbida por gonadotropina- coriónica humana, más gonadotro-
pina- coriónica humana radiactivada radioinmunológicamente,
determinándose el grado de inhibición producido por dicha mues-
tra en la reacción radioinmunológica entre los componentes de
dicho sistema, debida esencialmente a la gonadotropina corióni-
ca humana.

190 2). Procedimiento de conformidad con la reivindicación 1), ca-
racterizado por el hecho de que cada mililitro de antisuero
de gonadotropina- coriónica humana ha sido absorbido con 0,1
a 0,4 miligramos de gonadotropina- coriónica humana.

195 3). Procedimiento de conformidad con la reivindicación 1), ca-
racterizado por el hecho de que la inhibición es determinada
realizando una determinación radioinmúnológica de la muestra
y comparando los resultados con una norma conocida.

200 4). Procedimiento de conformidad con la reivindicación 1), ca-
racterizado porque mediante la utilización de una muestra de
orina, se comprueba positivamente el embarazo cuando la inhibi-
ción es superior al 20 % aproximadamente.

205 5). "PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION RADIOINMUNOLOGICA DE
GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA EN PRESENCIA DE HORMONA LUTEI-
NIZANTE".

ta Memoria consta de diez hojas foliadas y mecanografiadas
por un solo lado de sus caras.

Madrid, 15 de Septiembre de 1975

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized, cursive letter 'D' followed by a horizontal line extending to the right.