

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



19 ES	11 21	447474	10 A1
22	FECHA DE PRESENTACION 29-4-76		

P.- 62.800

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
47223	2-5-75	Israel
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	A61K	
54 TITULO DE LA INVENCION		
"UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA COMPOSICION DE SORO DIAGNOSIS PARA DETERMINAR SI UNA HEMBRA ESTA O NO EMBARAZADA"		
71 SOLICITANTE (S)		
RAFA LABORATORIES LTD.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
P.O.B. 405, Jerusalem. Israel.		
72 INVENTOR (ES)		
LEA GRUDDMAN		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
DON ALBERTO DE LABUNO MURQUEZ		

LIG

1 La presente invención se refiere a una composición
de serodiagnosís para un método de determinación del embara-
zo.

5 Se conocen diversos métodos para la determinación
del embarazo. Algunos métodos (métodos biológicos) requie-
ren el uso de un animal específico, por ejemplo, conejos,
ratones, ranas, etc. Estos ensayos biológicos tienen serias
desventajas; por ejemplo, requieren disponer y alojar nume-
rosos animales que satisfagan requerimientos específicos,
10 lo cual hace que el método sea complicado y caro. Además,
estos métodos requieren capacidades de laboratorio especia-
les y, generalmente, son lentos, es decir, los resultados
pueden obtenerse solamente al cabo de algunos días.

15 Por lo tanto, ha sido conveniente desarrollar al-
gunos métodos para la determinación del embarazo que supe-
ren las desventajas anteriores, es decir, que no requieran
animales, que no requieran ninguna técnica de laboratorio
específica, es decir, que puedan ser ejecutados en el con-
sultorio de un método y que proporcionen los resultados en
20 un tiempo relativamente corto.

Se ha encontrado que la mejor manera sería encon-
trar un reactivo químico con la ayuda del cual pudiera eje-
cutarse dicho ensayo.

25 En la memoria de patente de Israel número 16.425
se describen y reivindican ciertas composiciones de serodiag-
nosís para diagnosticar el embarazo. Sin embargo, se descri-
be solamente una composición específica que comprende hor-
mona de gonadotropina coriónica (CGTH) combinada a través
de la bis-diazo-bencidina (BDD) con glóbulos rojos de san-
gre de oveja y, eventualmente, incorporando también el anti-
30

1 cuerpo CGTH.

5 Sin embargo, dicha composición conocida es muy poco satisfactoria, puesto que la composición es inestable. Se ha tratado de superar dicha desventaja, añadiendo formalina como agente estabilizador. Aunque la estabilidad de la composición mejora, todavía no es satisfactoria, porque el periodo de almacenamiento de la composición obtenida es muy corto, si se vuelve a suspender el líquido, lo cual es ciertamente indeseable.

10 De la memoria de patente de Israel número 19.301, de la memoria de patente alemana número 1808435, y de la memoria de patente holandesa número 66-03909, se conocen composiciones de serodiagnosis en las que la HCG está unida a eritrocitos a través de ciertos aldehidos y otras sustancias, por ejemplo, un agente estabilizador. El uso de tal agente estabilizador es muy indeseable. Además, se ha encontrado que las composiciones obtenidas de acuerdo con las publicaciones anteriores, no son muy estables.

20 Por la memoria de patente de Israel número 34960 se conoce una composición que consiste esencialmente en gonadotropina coriónica humana (HCG) unida a glóbulos rojos de la sangre por medio de aldehido glutárico como agente de copulación entre éstos. Dicha composición constituye una gran mejora con relación a las composiciones conocidas. Sin embargo, su desventaja es que requiere todavía un tiempo bastante prolongado para efectuar el ensayo. Dicha desventaja puede superarse por ciertos métodos. Sin embargo, aún así, se necesitan aproximadamente 20 minutos para efectuar el ensayo. Además, la aptitud de almacenamiento de dicha composición no es enteramente satisfactoria y sólo po-

30

1 dría superarse mediante la adición de materiales adicionales, por ejemplo, gèlatina.

Se conocen algunas composiciones que utilizan como base ciertas partículas de latex, cuya composición se mantiene secreta por el fabricante. Sin embargo, aunque superan algunas de las desventajas expuestas anteriormente, todavía ofrecen algunas desventajas. Así, los aglomerados obtenidos como resultado de la aglutinación no son muy claros, y, por lo tanto, la ejecución no es siempre segura. Además, dichos aglomerados no siempre aparecen inmediatamente.

Por lo tanto, ha sido deseable encontrar una composición que supere dichas desventajas, es decir, que permita la ejecución del ensayo en tiempo muy corto, y que el ensayo ejecutado con ella proporcione resultados claros, que sean fáciles y seguros de determinar. Además, dicha composición debe ser fácilmente almacenable.

Se ha encontrado, sorprendentemente, que en el caso de que la γ -globulina esté absorbida sobre partículas inertes-neutras (como se han definido aquí) ésta puede copularse con ciertos agentes de copulación a la HCG y con la composición obtenida se puede efectuar el ensayo en el espacio de unos tres minutos, proporcionando resultados buenos y claros.

La presente invención consiste, por lo tanto, en una composición de serodiagnosís para determinar si una hembra está embarazada o no, consistiendo dicha composición esencialmente en una partícula neutra-inerte (como se ha definido aquí), sobre la cual está adsorbida la γ -globulina estando dicha γ -globulina copulada con un agente de copulación bifuncional, cuyos dos grupos funcionales poseen

1 diferentes grados de reactividad, estando copulado el otro grupo funcional de dicho agente de copulación, a la HCG.

Dicha composición se denominará en lo que sigue partículas de HCG sensibilizadas.

5 Las partículas neutras-inertes en relación con la presente invención, significan partículas que son neutras e inertes frente a otras partes de la composición, y que son aptas para adsorber γ -globulina de una manera irreversible. Tales compuestos son, por ejemplo, polibutadieno, 10 poliestireno, butadieno-estireno polimerizados, etc. Como partículas preferidas, se pueden mencionar partículas de látex de poliestireno.

El agente de copulación bifuncional preferido es el 2,4-diisocianato de tolueno (TDIC).

15 La γ -globulina puede obtenerse de cualquier mamífero disponible o de suero aviar.

La presente invención consiste, también, en la preparación de la composición de acuerdo con la presente invención, en la cual el agente de copulación es unido a un 20 pH bajo y a una temperatura baja, a la HCG, y el agente de copulación - HCG conjugado obtenido se enlaza a un pH y temperatura aumentados, a la γ -globulina adsorbida sobre la partícula inerte neutra.

En el caso de que el agente de copulación sea el 25 TDIC, la copulación de éste con la HCG se efectúa a una temperatura comprendida entre aproximadamente 0 y 10°C, preferiblemente 4°C (todas las temperaturas aquí mencionadas se indican en grados centígrados). El pH para esta reacción está comprendido entre 5,4 y 7,4, preferiblemente 7,2. 30 El conjugado TDIC-HCG es copulado a la γ -globulina a una

1 temperatura de aproximadamente 30-60°C, preferiblemente
40°C. El pH para esta reacción está comprendido entre 7,6
y 9,2, preferiblemente entre 8,2 y 8,3.

5 La concentración del conjugado TDIC se elige de
tal modo que se determine la sensibilidad requerida del en-
sayo.

En el caso de que se utilice un látex de polies-
tireno, dicha concentración es de aproximadamente 2,5 has-
ta 5 mg/A.g. poliestireno (10 ml de suspensión del 10%).

10 La composición de acuerdo con la presente inven-
ción es muy estable y no se descompone durante el almace-
namiento, y el conjugado no será liberado durante la eje-
cución del ensayo.

15 La presente invención consiste, también, en un
método para la determinación del embarazo, que comprende
mezclar la composición de serodiagnosís anteriormente men-
cionada, con un anti suero HCG y un fluido fisiológico de
una mujer de la que se sospecha que está embarazada. En el
caso de que la mujer esté embarazada, es decir, que la HCG
20 esté presente en el fluido fisiológico, el anti suero HCG
reaccionará con el HCG libre y no ocurrirá reacción entre
las partículas de HCG sensibilizadas y el antisuero. Alter-
nativamente, es decir cuando la mujer no está embarazada, el
antisuero provocará la aglutinación al cabo de unos 3 mi-
25 nutos. Se obtienen aglomerados grandes y muy buenos y la
aglutinación se inicia casi instantáneamente.

La presente invención será ilustrada ahora con
referencia a los ejemplos que se acompañan, sin quedar res-
tringida por ellos.

30 Ejemplo 1.

1 Preparación de partículas de látex sensibilizado
 con HCG

a. Preparación de γ -globulina de suero de conejo normal
 (NRS).

5 10 ml de suero se introducen en un baño de 50 ml,
 el cual se coloca sobre un agitador magnético. Bajo agita-
 ción constante del suero, se añaden 6 ml de una solución
 saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, muy lentamente. El pH se ajusta, se-
 guidamente, hasta 7,4 mediante la adición de una solución
10 de NaOH 1 N. Se continúa la agitación durante 30 minutos a
 la temperatura ambiente. El contenido se introduce en un
 tubo o tubos de centrifuga y se centrifuga a la temperatu-
 ra ambiente, durante 30 minutos, a 1.000 x g. El líquido
 sobrenadante se desecha. El sedimento se disuelve en solu-
15 ción salina y el volumen se completa hasta 10 ml.

 Seguidamente, se transfiere la solución a un vaso
 de 50 ml. Bajo agitación constante como antes, se añaden
 lentamente 5 ml de solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y se ajust-
 ta el pH a 7,4. Se repite la precipitación una vez más, di-
20 solviendo el precipitado en solución salina.

 El precipitado final se disuelve seguidamente en
 10 ml de solución salina y se dializa en frío contra agua
 destilada bajo agitación. Al día siguiente se cambia el
 fluido externo por PBS (NaCl, 0,15 molar, tampón fosfato de
25 0,01 M, pH 7,2).

KH_2PO_4	0,1 M 132 ml
Na_2HPO_4	0,1 M 289 ml
NaCl	34.785 g up to 4.210 ml

 y se continúa la diálisis durante 48 horas con dos cambios
30 de PBS. El fluido exterior (dializado) se ensaya para de-

1 terminar la presencia de SO_4 (a 3 ml de dializado se añade un volumen igual de BaCl_2 al 1% y algunas gotas de HCl 1 N).

5 Cuando el ensayo de determinación de SO_4^{-2} es negativo, se centrifuga el contenido del tubo de diálisis a 10.000 rpm. durante 20 minutos, en frío. El líquido sobrenadante se recoge. La concentración de γ -globulina se fija por Densidad Óptica a 280 micrometros, para uso de cálculo $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 14,6$.

b. Preparación del conjugado TDIC.

10 85,2 mg de HCG (Obtenida de Roussel Uclaf, que contiene 3.580 unidades/mg) se disuelven en 3,9 ml de solución salina. Se añaden a la solución 35,1 ml de tampón de fosfato 0,15 M, pH 7,2, la cual se enfría seguidamente en una mezcla de agua y hielo (dicho tampón consiste en 15 140 ml de NaH_2PO_4 0,15 M y 360 ml de Na_2HPO_4 0,15 M). Se añaden 0,78 ml (0,955 g) de 2,4-diisocianato de tolueno. La solución se incuba durante 30 minutos en agua helada, con agitación magnética y, seguidamente, se centrifuga durante 20 minutos a 10.000 rpm. en una centrífuga refrigerada (0-4°C).

20 El líquido sobrenadante se mantiene durante una hora en hielo y, seguidamente, se filtra en frío a través de un papel GFLC de fibra de vidrio, Whatman. El filtrado se divide en partes alícuotas de 2,5 ml y se congela inmediatamente. Si es necesario, se descongela el contenido de 25 un tubo y se mantiene en hielo hasta el uso. La solución restante se desecha. El conjugado TDIC se congela a -18°C.

c. Preparación de las partículas sensibilizadas

30 A 10 ml de una suspensión de látex (Dow-Latex, 0,481 u, Serva Feinbiochemica Heidelberg), substancia seca

1 10%, se añaden 107,3 ml de un tampón de glicina-NaOH. Dicho
tampón, que tiene un pH 8,2, comprende glicina 7,3 g; NaCl
10,9; y NaOH 1 g/litro. (el pH se ajusta a 8,28 mediante
5 de γ -globulina de NRS preparada como se ha descrito en la
operación a, diluidos previamente con tampón de glicina
NaOH, de tal modo que se obtenga una concentración de 80-85
microgramos/ml (Densidad Óptica a 280 micrometros 0,117-0,124).

La solución se incuba a la temperatura ambiente
10 con agitación ocasional (20-25°) durante 30 minutos. Después,
se centrifuga ésta en frío (4-8°) durante aproximadamente 5
minutos a 10.000 rpm. El sedimento se lava dos veces con so-
lución salina de borato, utilizando cada vez 300 ml de so-
lución.

15 El sedimento se vuelve a suspender en 111,5 ml
de tampón de borato de pH 8. La suspensión se calienta a
40°C en un baño de agua.

El tampón de borato se prepara mezclando de 12 a
37 g de H_3BO_3 y 8 g de NaCl. A dicha mezcla se añaden apro-
20 ximadamente 250 ml de agua bidestilada. Se añaden 0,52 g
de NaOH y se ajusta el pH a 8. Después, se completa el vo-
lumen hasta 8.

La solución salina de borato se prepara mezclan-
do 30 ml del tampón de borato anterior con 970 ml de solu-
25 ción salina (NaCl 0,85%).

A la suspensión se añaden 2,1 ml de conjugado
TDIC preparado como se ha descrito en la operación b. La so-
lución se incuba a 40°C durante una hora, con agitación oca-
sional, y se centrifuga como se ha descrito anteriormente.
30 El sedimento se lava dos veces con solución salina de bora-

1 to, utilizando cada vez 300 ml de solución.

El sedimento se vuelve a suspender en 71,4 ml de solución salina de borato que contiene 0,1% de NaN_3 y 0,1 % de BSA, preparado disolviendo 100 mg de NaN_3 y 100 mg de
5 BSA en 100 ml de solución salina de borato, (denominado en lo que sigue "reactivo I") (BSA representa albúmina de bovino cristalizada de la Pentex Biochemicals).

Ejemplo 2.

Preparación de antisuero HCG

10 5 ml de una solución de HCG que tiene una concentración de 250 μ /ml preparada en tampón de fosfato de pH 7,2, teniendo dicha HCG una potencia de 18.000 μ /mg se mezclan con 5 ml de coadyuvante Completo de Freund (Difco). La mezcla se emulsifica bien.

15 A cada uno de los conejos se inyectan 2 ml de la emulsión anteriormente mencionada, por vía intradérmica, en el lomo y en los miembros afeitados, en 40 puntos, con 0,05 ml/punto. En un punto separado se inyectan 0,5 ml de vacuna cruda de Pertussis Bordetella (32 md. organismos/ml), por
20 vía intradérmica.

Se recogen muestras de sangre al cabo de 3 semanas y, a intervalos de 10 días o tres veces más, de acuerdo con el título de aglutinación del suero. Al cabo de unas siete semanas se sangran los conejos y se separa el suero
25 por centrifugación y se almacena en un refrigerador.

Los anticuerpos no específicos son adsorbidos desde el suero por mezclado de un volumen igual del suero con polímero lavado preparado a partir de suero humano normal (que no contiene HCG). La mezcla obtenida se denomina "anti-
30 -HCG adsorbida".

1 El suero obtenido se diluye en solución salina de borato que contiene NaN_3 0,1 %, BSA 0,1% y Ficol 1%. (Ficol es poli-epiclorhidrina 400.000 de la Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala). Dicho reactivo se prepara por disolución de
5 100 ml de cada uno de los reactivos en 100 ml de solución salina de borato. La aglutinación de punto final se determina utilizando una suspensión sensibilizada de látex preparada como se ha descrito en el Ejemplo 1.

10 La inhibición de la aglutinación se ensaya con tabletas normalizadas de HCG de la Wellcome Reagents Ltd., disueltas en reactivo I.

Se escoge la dilución más alta de antisuero que proporciona una aglutinación 4+ en presencia de 50 microlitros de reactivo I y una inhibición completa por 50 microlitros de tabletas standard de HCG como se ha indicado anteriormente, que contiene 1,5 u/ml.

Ejemplo 3.

1. Una gota de orina de la mujer se coloca dentro de uno de los círculos de un portaobjetos.

20 2. Se añade una gota de antisuero.

3. Se mezclan las dos gotas con una varilla de vidrio y se hace oscilar el portaobjetos durante un minuto.

4. Se añade una gota de las partículas de látex sensibilizadas.

25 5. La suspensión se mezcla de nuevo con una varilla de vidrio limpia. El líquido se extiende de tal modo que llene la zona dentro del círculo impreso en el portaobjetos.

6. El portaobjetos se hace oscilar lenta y suavemente de un lado a otro, durante 2 minutos exactamente. Los
30 resultados se leen inmediatamente.

1 La aglutinación indica un resultado negativo, es decir que la mujer no está embarazada. Un resultado poco definido indica la presencia en la orina de un mínimo de 1.500 unidades de HCG/litro.

5 Ejemplo 4.

Con el fin de determinar la sensibilidad del ensayo, se comparó una composición de la presente invención (composición d) con una composición asequible en el comercio.

10 Dichas composiciones eran:

- a. Composición de la sociedad solicitante, denominada Pregnograph como se describe en la memoria de patente de Israel número 34960 (composición A).
- b. Una composición de látex de la Wellcome Foundation Ltd., denominada Prepurex (Composición B).
- 15 c. Una composición de látex de la Organon N. V., denominada Planotest (Composición C).

Los resultados se muestran en la Tabla I.

TABLA I

20 Experimento Nº	Numero de en- sayos	A		D		B		C	
		Posi- tivo	Nega- tivo	Posi- tivo	Nega- tivo	Posi- tivo	Nega- tivo	Posi- tivo	Nega- tivo
1	20	8	12	8	12	8	12	8	12
2	47	28	19	28	19	28	19	27	20
3	34	14	20	14	20	14	20	14	20
25 4	46	26	20	26	20	26	20	26	20
5	57	30	27	30	27	30	27	30	27
6	28	22	6	22	6	22	6	22	6
7	59	29	30	29	30	29	30	29	30
8	67	30	37	30	37	30	37	30	37
30 9	82	50	32	50	32	50	32	50	32

1 La sensibilidad de todos los ensayos es substan-
cialmente la misma. Sin embargo, la composición de acuerdo
con la presente invención, posee las ventajas que se han
expuesto anteriormente.

5

- REIVINDICACIONES -

10

Los puntos de invención propia y nueva, que se
presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente
de Invención, en España, son los que se recogen en las
reivindicaciones siguientes:

15

1ª.- Un procedimiento para la preparación de una
composición de serodiagnosís para determinar si una hembra
está o no embarazada, consistiendo dicha composición esen-
cialmente en una partícula neutra-inerte (como se ha defi-
nido en esta memoria) sobre la cual se adsorbe γ -globulina,
estando dicha γ -globulina copulada a un agente de copula-
ción bifuncional, cuyos dos grupos funcionales poseen dife-
rentes reactividades, estando copulado el otro grupo funcio-
nal de dicho agente de copulación, a gonadotropina corióni-
ca humana, caracterizado porque el agente de copulación se
combina a una temperatura baja a un pH bajo con la gonado-
tropina coriónica humana, y el conjugado de agente de copu-
lación y gonadotropina coriónica humana obtenido, se enla-
za, a una temperatura y pH mayores, con la γ -globulina ad-
sorbida sobre la partícula neutra-inerte.

20

25

30

1 2ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindi-
cación 1ª, en el que la partícula neutra-inerte es un látex
de poliestireno.

5 3ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindi-
cación 1ª, en el que el agente de copulación es 2,4-diisocia-
nato de tolueno (TDIC) TDIC.

10 4ª.- Un procedimiento de acuerdo con las reivin-
dicaciones 5ª o 3ª, en el que la combinación del agente de
copulación con la gonadotropina coriónica humana se efectúa
a 0-10°C, preferiblemente a 4°C.

15 5ª.- Un procedimiento de acuerdo con las reivin-
dicaciones 1ª o 4ª, en el cual la combinación del agente de
copulación con la gonadotropina coriónica humana se efectúa
a un pH comprendido entre 5,4 y 7,4, preferiblemente de 7,2.

20 6ª.- Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de
las reivindicaciones 1ª a 5ª, en el cual el conjugado de
agente de copulación de gonadotropina coriónica humana se
enlaza con la γ -globulina a 30-60°C.

25 7ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindi-
cación 5ª, en el que dicha temperatura es de aproximadamen-
te 40°C.

30 8ª.- Un procedimiento de acuerdo con cualquiera
de las reivindicaciones 1ª a 7ª, en el cual el conjugado de
agente de copulación y gonadotropina coriónica humana se en-
laza con la γ -globulina a un pH comprendido entre 7,6 y 9,2,
preferiblemente entre 8,2 y 8,3.

9ª.- UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA
COMPOSICION DE SERODIAGNOSIS PARA DETERMINAR SI UNA HEMBRA
ESTA O NO EMBARAZADA.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que an-



1 tecede y para los fines que se han especificado.


Esta Memoria consta de quince hojas escritas a máquina por una sola cara.

5

Madrid, 29. ABR. 1976

P.A.

10

Alberto de ~~Alcalá~~
Por Poder.


15

20

25

30


IAG/