



10 ES	11 NUMERO	15 A1
	21	
	22 FECHA DE PRESENTACION	

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G01N	

64 TITULO DE LA INVENCION

PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION SIMULTANEA DE UNA PLURALIDAD DE HORMONAS EN UNA SOLA MUESTRA ACUOSA.

71 SOLICITANTE (S)

CARTER-WALLACE, INC.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

767 Fifth Avenue, New York, New York 10022, EE.UU. de A.

72 INVENTOR (ES)

Dr. Brij B. Saxena.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

Don JOSE MIGUEL GOMEZ-ACEBO Y POMBO

5. El presente invento se refiere a un procedimiento y medios para la determinación de gonadotropina coriónica humana hormonal (UCG), hormona luteinizante (LH) y prolactina (PRL), y, de un modo más especial, se refiere a un método fundamentalmente nuevo y medios para detectar el embarazo en la mujer.

10. Los ensayos para detectar el embarazo se basan generalmente en la determinación de hormonas que se producen por la placenta en desarrollo, por ejemplo hormonas gonadotrópicas similares a las producidas por la glándula pituitaria anterior y hormonas esteroides similares a las del ovario y la glándula adrenal. Los análisis de embarazo en la práctica actual se basan casi exclusivamente en un análisis de la hormona placentar, la gonadotropina coriónica humana (HCG). Esta hormona se encuentra en el fluido corporal (suero de la sangre y orina) solamente durante el embarazo, a excepción de otras 15. varias condiciones del cuerpo muy raras que se producen las hormonas. La Unidad Internacional (I.U.) de la HCG se adoptó en 1.938 y se define como la actividad gonadotrópica específica de 0,1 miligramo de una muestra deshidratada mantenida en 20. los Institutos Nacionales de la Salud, Londres, Inglaterra.

Los análisis iniciales del embarazo se basaban en métodos biológicos in vivo para determinar la presente de HCG. Por ejemplo, la prueba primitiva, conocida como prueba de Aschheim-Zondek se basaba en la capacidad de la HCG inyectada por vía subcutánea en los ratones para producir corpora lutea. La prueba de Friedman es otra prueba biológica según 25. la cual una muestra de orina de embarazo sospechado se inyecta en la vena de la oreja de una coneja adulta que se había aislado de tres a cuatro semanas, y 48 horas después de la 30. inyección los ovarios se examinan para encontrar folículos

- hemorrágicos rotos, lo cual indica una reacción positiva. Una prueba menos conocida desarrollada por Kupperman en 1943 comprende la inyección de la orina de la paciente en una rata hembra con ulterior inspección del ovario para hallar signos de hiperémia. A pesar de que las dos horas necesarias para realizar esta prueba es un periodo considerablemente más corto que las 48 horas necesarias para la prueba de Friedman y los casi 5 días exigidos por la prueba de Aschheim-Zondek, esta prueba no es fiable puesto que exige un técnico especialista para diferenciar un ovario negativo ligeramente rosáceo de un ovario positivo enrojecido y conseguir un alto grado de precisión. Una prueba desarrollada por Galli y Mainini a finales de los años 40 exige tan solo aproximadamente dos horas para realizar la prueba: no obstante, esta prueba exige la inyección de la orina de las pacientes en ranas con ulterior observación de inyección de espermatozoides, y estos animales son relativamente insensibles si se compara con los conejos, ratones y ratas.

- Todas las pruebas biológicas anteriores tienen graves inconvenientes, incluyendo la disponibilidad de animales, la necesidad de mantener una gran colonia de animales, y los periodos relativamente largos de ensayos, dando lugar frecuentemente a resultados falsos positivos y negativos y, lo que es más importante, el hecho de que una prueba positiva puede conseguirse tan solo con un 95% de fiabilidad después de un periodo de 25 a 30 días siguientes a la ovulación.

- Una segunda generación de pruebas de embarazo desarrolladas durante el primer periodo de los años 60 se caracteriza como procedimientos inmunológicos o inmunoquímicos. Como la HCG es una hormona proteínica, actúa de una forma

- antigenical en una especie heterologa. Por consiguiente, cuando se inyecta HCG mediante técnicas apropiadas en un animal de ensayo apropiado, normalmente un conejo, se produce un anticuerpo contra la HCG en el animal. En las primeras pruebas utilizando este principio, se intentó utilizar la reacción de precipitina directa antígeno-anticuerpo, según la cual se formaría un precipitado visible como resultado de la combinación de HCG y su anticuerpo, para detectar la presencia de esta hormona. Los procedimientos más comunes comprenderían los llamados métodos indirectos de determinación, como la prueba de deslizamiento de partículas de latex de Brody y Carlstrom y la prueba de emaglutinación e inhibición de Wide y Gemzel. En el primero de los procedimientos, se añade un antisuero a la orina de una paciente seguido de un vehículo de latex que se ha recubierto con HCG. Si el espécimen de orina es de una mujer embarazada y contiene HCG, los anticuerpos en el antisuero se neutralizarán y no reaccionarán, por lo tanto, con la HCG recubierta sobre el vehículo para producir aglutinación. En el último de los métodos, se emplea un principio similar excepto que el indicador comprende HCG conjugada con glóbulos rojos o glóbulos rojos formalidizados. La primera prueba puede llevarse a cabo en un periodo de tan solo dos minutos, mientras que la segunda exige aproximadamente dos horas. Para estos procedimientos de ensayo se puede emplear la orina o la sangre de la paciente.
- En un procedimiento de pruebas de embarazo desarrollado muy recientemente, basado en una modificación del mecanismo inmunológico básico, se emplea medios radiológicos para detectar y/o medir la presencia de HCG en la sangre de la paciente (o la orina). Véase, por ejemplo, Goldstein et al.,

en Fert. Steril, volumen 23, página 817 (1972). En estas pruebas de radioinmunoanálisis el anticuerpo se pone en contacto con una mezcla del fluido corporal de la paciente y una cantidad conocida de HCG radioisotopizada, y la HCG en la muestra de ensayo y la HCG radioactivada compiten por la interacción con el anticuerpo del HCG. En anticuerpo se separa entonces del fluido y se puede analizar radiológicamente una fracción para determinar las proporciones respectivas de la HCG radioactivada y sin radioactivar que quedan unidas a los anticuerpos, y la concentración de HCG en la muestra se puede calcular a partir de esta información puesto que la proporción de HCG radioactivada y sin radioactivar se encontrará en la misma proporción en ambas fracciones. Las técnicas de radioinmunoanálisis han salvado una limitación importante de la prueba del embarazo inmunoquímica, o sea, la de la sensibilidad. Las técnicas de radioinmunoanálisis son varios miles de veces más sensibles que las pruebas indirectas descritas anteriormente y, por consiguiente, permiten detectar el embarazo con anterioridad a los 25 a 30 días siguientes a la ovulación que exigía la prueba de deslizamiento de la partícula del latex y la prueba de emaglutinación. No obstante, aún cuando se puede detectar el embarazo al cabo de 10 ó 12 días siguientes a la ovulación con un 95% de fiabilidad por el método de radioinmunoanálisis, estas pruebas tienen el inconveniente de que exigen más tiempo para llevarlas a cabo, normalmente un periodo de 24 a 48 horas. No obstante, el más grave inconveniente que tienen todas las técnicas de pruebas de embarazo conocidas comprende la indicación frecuente de resultados falsos positivos y negativos. En el caso de la prueba de embarazo inmunoquímica, esta dificultad se debe a una respuesta inmune

- no específica relacionada con las reacciones anticuerpo-antígeno específicas. Por ejemplo, la presencia de una hormona común, la hormona estimulante de folículos "among" alfa-subunidad no específica (FSH), hormona luteinizante (LH), HCG y hormona estimulante del tiróides (TSH), y homonologías en la secuencia de aminoácidos de la beta-subunidades de hormonas específicas han causado dificultades adicionales en la producción de antisueros específicos para utilizarse en las técnicas inmunoquímicas. Estas dificultades aparecen exageradas en los métodos de radioinmunoanálisis debido al alto grado de sensibilidad de esta técnica. Este último inconveniente se ha resuelto parcialmente produciendo antisueros específicos a la subunidad de beta de HCG; no obstante, esta manipulación exige el empleo de material valioso, inmunización, selección y purificación para conseguir anticuerpos específicos, cuyos procedimientos exigen tiempo resultan costosos y son muy complicados. A pesar de estas precauciones, no se ha conseguido la meta de prácticamente 100% de fiabilidad en la detección del embarazo.
- Además, existe la grave necesidad de disponer de medios para detectar embarazos ectópicos en el momento más temprano posible. Dichos embarazos dan resultados negativos en las pruebas de emaglutinación o de deslizamiento del latex en el 40 al 60% de los pacientes, aún después del periodo de 25-30 días siguientes a la ovulación exigido para realizar estas pruebas. La razón de estos resultados se debe a la creencia de que las técnicas de prueba de embarazo inmunoquímicas consiguen la detección de un embarazo solamente después de haberse producido la implantación del óvulo fertilizado. Según se ha descrito anteriormente, todos los méto-

5. dos de pruebas de embarazo conocidos con anterioridad a este invento tienen el inconveniente de que son eficaces hasta después de la nidación. Una prueba que podría determinar la presencia de un embarazo durante el periodo entre la fertilización del óvulo y la implatación del óvulo fertilizado caracteraría de valor para el tratamiento de, por ejemplo, del aborto en potencia en la mujer que habitualmente aborta, casos que implican insiminación artificial y caso relacionados con los nuevos métodos anticonceptivos que terminan efectivamente en un embarazo antes de la implantación.

10. La presencia de receptores específicos para las diversas hormonas se ha sospechado desde hace tiempo en casos de seres humanos y aniales, y los investigadores han tenido éxito en la mitad de la última década con relación a
15. identificar y estudiar directamente algunos de estos receptores y su interacción con muchas hormonas respectivas. Los estudios preliminares realizados por el inventor de la presente han sugerido la presencia de un receptor para HCG en el corpus luteum de ratas preñadas o seodupreñadas. Véase gonadotropinas, capítulo 21, 1972, John Wiley. No obstante
20. estos estudios preliminares no han dado indicación de si hay presente un receptor similar en los seres humanos u otros animales, si el receptor hallado en las ratas es específico de la especie o específico a un de la HCG, si sería un indicador fiable de la HCG en muestras de fluido del cuerpo o si
25. es estable en un periodo prolongado de tiempo.

30. La prolactina (PRL) representa una hormona que durante muchos años no se ha creído se encontraba presente en los seres humanos. Su presencia en los seres humanos se confirmó en los primeros años de los 1.970. La presencia

- de receptores de PRL en el tejido de las glándulas mamarias se ha documentado, y se cree que la hormona representa un papel en el cáncer de mama, tumores de la pituitaria, desórdenes de lactancia, hipotiroidismos y otros desórdenes. Se cree que existen hasta 84 funciones diferentes de la PRL que comprende interacción compleja con otras hormonas gonadales y agrenales de la pituitaria, posiblemente representando un papel de regulador intermediario para esas otras hormonas. También se ha sugerido un papel luteotrópico así como luteolítico de la PRL durante el ciclo de estudios con las ratas, y se ha desarrollado una cierta evidencia en los últimos años con relación a los estudios realizados con ratas. La fijación específica de PRL al ovario de la rata se ha sugerido muy recientemente en la literatura, pero no se ha identificado un receptor específico. Véase Turkington et al., *Rec. Prog. Horm. Res.*, 29: 417 (1973). Los estudios realizados por diversos investigadores han sugerido que la PRL ejerce muy poca función en el mantenimiento del corpus luteum en seres humanos. Véase Hwan et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 68: 1902 (1971); Midgley et al., *Proc. IV Int. Cong. Endocrinal.*, Int. Cong. Series Nº 273, Excerpta Medica, Amsterdam, 1972.

- En vista de las enfermedades arriba identificadas que se sabe comprenden la hormona PRL, frecuentemente es conveniente determinar y/o verificar el contenido de PRL en una muestra de prueba obtenida de un sujeto, por ejemplo, una muestra de un fluido corporal. En algunos casos, solamente se puede disponer de pequeñas muestras, v.g., casos pediátricos y, por lo tanto, es conveniente disponer de una prueba muy específica que exija solamente una pequeña muestra y tan solo un corto periodo de tiempo para llevarla

5. a cabo. Específicamente es conveniente, para diferenciar de otras especies de hormonas que pudieran estar presente en la muestra, lo cual es particularmente conveniente en aquellos casos en que pudiera desearse determinar simultáneamente o medir dos o más hormonas. En el momento presente no existe medio específico fidedigno para hacer dicha determinación.

10. Por lo tanto, un objeto del presente invento es proporcionar un procedimiento para determinar la gonadotropina coriónica humana (HCG), hormona luteinizante (LH), prolactina (PRL) y materias del tipo de la HCG en una muestra acuosa.

15. Otro objeto del presente invento consiste en proporcionar un método de prueba de embarazo que produce prácticamente un 100% de fiabilidad en el diagnóstico del embarazo. Es también un objeto del presente invento proporcionar un procedimiento para detectar el embarazo ectópico y el aborto en potencia, con el cual se puede aseverar el estado de embarazo al cabo de 6 a 8 días siguientes al comienzo del embarazo.

20. Otro objeto adicional del presente invento consiste en proporcionar un método de diagnóstico del embarazo según el cual se puede detectar un embarazo a partir del sexto al octavo día siguiente a la ovulación con casi un 100% de fiabilidad.

25. Adicionalmente el presente invento tiene por objeto proporcionar un medio para determinar la presencia de la hormona HCG en una muestra acuosa, particularmente con el fin de reconocer el embarazo en la mujer investigando una muestra de fluido del cuerpo.

30. Otro objeto del invento consiste en proporcionar un método para medir el contenido de PRL en una muestra acuosa especialmente en una muestra de fluido corporal.

El invento tiene también por objeto proporcionar un método y medios para determinar de una forma simultánea la HCG, o LH y PRL en una muestra acuosa, particularmente una muestra muy pequeña de fluido corporal.

5. Otro objeto del presente invento consiste en proporcionar el receptor particular empleado en el método de radio análisis de receptor expuesto anteriormente.

10. También es un objeto del presente invento proporcionar un método para producir el receptor específico empleado en el método de radio análisis de receptor mencionado anteriormente.

15. Para conseguir los objetos expuestos, se proporciona, según el presente invento, un método para determinar la gonadotropina coriónica humana (HCG), hormona luteinizante (LH) y materia del tipo de la HCG y/o prolactina (PRL) en una muestra acuosa que comprende las fases de poner en contacto dicha muestra con un agente capaz de fijar de una forma selectiva la hormona, proporcionar un medio de indicar si dicha fijación ha tenido lugar y observar los medios indicadores para
20. determinar la presencia de la hormona en la muestra, en cuyo método un aspecto particularmente mejorado comprende el agente de fijación que es un extracto de membrana del plasma procedente del corpus luteum de un animal que posea el receptor para la hormona HCG y/o PRL. El sistema indicador empleado en
25. este procedimiento puede ser cualquiera de los empleados tradicionalmente en un método inmuniquímico similar para determinar proteínas y/o polipeptidos. Por ejemplo, el indicador puede ser una materia que se haya tratado con la hormona de modo que en presencia del receptor en cuestión se decolore el
30. indicador, tome color, se aglutine, se precipite o dé alguna

otra indicación visible (por ejemplo fluorescencia) o la presencia o ausencia de la hormona en el fluido analizado o, preferiblemente, se pueden emplear las técnicas de medición radiológica precisas.

5. Al aplicar este método para determinar embarazo en mujeres, una muestra de sangre u orina se pone en contacto con el receptor específico descrito anteriormente y se determina la presencia o ausencia de HCG en la muestra basándose en la cantidad de evidencia de fijación por el sistema indicador.

10. En una modalidad de preferencia del presente invento se proporciona un procedimiento para determinar HCG en una muestra acuosa, preferiblemente el suero sanguíneo u orina de una paciente que se supone en cinta, y que comprende poner en contacto un receptor altamente específico para la hormona HCG, cuyo receptor es un extracto de la membrana del plasma procedente del corpus luteum de un animal que posea el receptor para esta hormona, llevando la muestra acuosa añadida una cantidad de HCG irradiada con un isótopo radioactivo. En este método, la posible HCG presente en la muestra y parte de la HCG irradiada radioactivamente se fijan al receptor. El receptor con su HCG fijadas se separa entonces de la muestra acuosa, y se mide la radioactividad de una o ambas de las fracciones separadas para determinar la concentración de HCG en la muestra acuosa, estando esta concentración en función a la radioactividad de vida. Es preferible obtener el receptor del corpus luteum de una vaca, oveja, yegua o cerda, particularmente de un animal preñado y, con mayor preferencia, un animal durante el primer trimestre de gestación.

20. Otra modalidad comprende un procedimiento para deter-
- 25.
- 30.

5. minar la prolactina hormonal (PRL) en una muestra acuosa, de nuevo preferiblemente un fluido corporal, que comprende las fases de poner en contacto las muestras con un receptor altamente específico para la PRL, siendo este receptor también un extracto de la membrana del plasma del corpus luteum de un animal que posea este receptor, y proporcionar en la muestra una cantidad de PRL irradiada con un isótopo radioactivo. Las fases restantes son idénticas a las expuestas anteriormente para determinar la HCG. Este procedimiento se puede utilizar como
10. indicación de embarazo en una mujer o para indicar otros desórdenes que comprendan la presencia de prolactina.

15. También se proporciona según el invento un procedimiento para determinar simultáneamente las dos o más hormonas diferentes contenidas en una sola muestra acuosa. En esta modalidad, las fases son similares a las empleadas para medir hormonas simples, excepto que la muestra acuosa se pone en contacto con uno o más agentes capaces de fijar de una forma selectiva cada una de las hormonas que se desea determinar; proporcionar un medio separado y distinguible para indicar
20. si ha tenido lugar la fijación de cada hormona y observar cada uno de los indicadores para determinar la presencia de cada hormona. El agente de fijación es un extracto de la membrana del plasma procedente de un órgano corporal de una especie que se sabe posee el órgano un receptor específico
25. para cada una de las hormonas que se desea medir. El receptor es preferiblemente un extracto de la membrana del plasma del corpus luteum de un animal mamífero o sea lugares receptores para ambas hormonas HCG y PRL. Los medios indicadores preferibles, comprenden isótopos radioactivos diferentes, por ejemplo,
30. isótopos diferentes de yodo como por ejemplo, I^{125} , I^{131} .

H³ y C¹⁴. Con dicho indicador, se puede medir simultáneamente HCG y PRL poniendo en contacto el receptor con la muestra y radioactivando de una forma diferente HCG y PRL, de forma que parte de las hormonas radioactivadas y sin radioactivar se fijan al receptor, separando la hormona radioactivada y sin radioactivar de la muestra, y contando la radioactividad de cada especie de isótopo para determinar la presencia de las hormonas respectivas en proporción a la radioactividad medida.

5.

En otra modalidad del presente invento, se proporciona un agente reactivo para la determinación química del receptor de la hormona HCG, cuyo agente reactivo comprende una forma prácticamente pura de fracción específica de extracto de la membrana del plasma procedente del corpus luteum de un animal que posee el receptor para la HCG, siendo la fracción específica aquella que pueda fijar de una forma selectiva la gonadotropina coriónica humana biológicamente activa.

5.

En otra modalidad del presente invento, se proporciona un procedimiento para la preparación de un agente reactivo para la determinación química en receptor de la hormona HCG, que comprende las fases de preparar un homogenado de tejido finamente dividido procedente del tejido del corpus luteum de un animal que posea el receptor para la HCG; separar las membranas del plasma de dicho homogenado y elegir la fracción de una forma selectiva gonadotropina coriónica humana biológicamente activa.

5.

5.

El procedimiento de prueba en cuestión es también idóneo para detectar la preñez en animales. Por consiguiente, se puede emplear para detectar la preñez en cualquiera de las especies de animales en las que se encuentre el receptor específico del invento, v.g., animales mamíferos y, posiblemente

5.

te, animales no mamíferos elegidos.

5. Otra modalidad del invento comprende medios para la determinación de gonadotropina coriónica humana (HCG), hormona luteinizante (LH) o materia similar a la HCG en una muestra acuosa, que comprende: (a) un primer agente reactivo y un segundo agente reactivo; (b) comprendiendo el primer agente reactivo, en una forma prácticamente pura, la fracción específica del extracto de la membrana del plasma procedente del corpus luteum de una especie que tenga el receptor para la gonadotropina coriónica humana capaz de fijar de una forma selectiva gonadotropina coriónica humana biológicamente activa; (c) comprendiendo el segundo agente reactivo gonadotropina coriónica humana radioactivada capaz de emitir radiación, estando destinado el primer agente reactivo a ponerse en contacto con la muestra que contiene la hormona que se desea medir y con el segundo agente reactivo para fijar parte de la hormona radioactivada y sin radioactivar a dicho receptor; (d) medios para medir la cantidad de hormona radioactivada fijada al receptor, estando la radiación emitida en función a la concentración de la hormona en la muestra acuosa. Esta modalidad adopta preferiblemente la forma de un aparato de pruebas de embarazo.
- 10.
- 15.
- 20.

25. Según el invento se proporciona también un medio para determinar la prolactina (PRL) en una muestra acuosa, que comprende: (a) un primer agente reactivo y un segundo agente reactivo; (b) comprendiendo el primer agente reactivo, en forma prácticamente pura, la fracción específica del extracto de la membrana del plasma procedente del corpus luteum de una especie que tenga el receptor para la prolactina capaz de fijar de una forma selectiva prolactina biológi-
- 30.

5. camente activa; (c) comprendiendo el segundo agente reactivo prolactina radioactivada capaz de emitir radiación, estando destinado el primer agente reactivo a ponerse en contacto con la muestra que contiene la hormona que se desea medir y con el segundo agente reactivo para fijar parte de la hormona radiactivada y sin radioactivar a dicho receptor; (d) medios para medir la cantidad de hormona radioactivada fijada al receptor, estando la radiación emitida de la misma en función a la concentración de la hormona en la muestra acuosa.
10. Finalmente, en otra modalidad del invento, se proporciona un medio para determinar una pluralidad de hormonas en una muestra acuosa, que comprende: (a) un primer agente reactivo y una pluralidad de segundos agentes reactivos en número igual al número de hormonas que se desea determinar;
15. (b) comprendiendo el primer agente reactivo, en forma prácticamente pura, la fracción específica del extracto de la membrana del plasma procedente de un órgano corporal de una especie que tenga el receptor específico en dicho órgano para fijar de una forma selectiva cada una de las hormonas en forma biológicamente activa; (c) comprendiendo los segundos agentes reactivos cada una de las hormonas que se desea determinar en forma radioactivada capaz de emitir radiación. Siendo dicha radiación emitida diferente para cada hormona radioactivada, estando destinada o el primer agente radioactivo a ponerse en contacto con la muestra que contiene la hormona que se desea medir y con los segundos agentes reactivos para fijar parte de las hormonas radioactivadas y sin radioactivar a dicho receptor; (c) medios para medir la cantidad de hormonas radioactivadas fijadas al receptor, estando la radiación emitida de cada hormona radioactivada en
- 20.
- 25.
- 30.

función a la concentración de la hormona respectiva en la muestra acuosa. En esta modalidad, el primer agente reactivo es preferiblemente el extracto de la membrana del plasma de un animal mamífero y los segundos agentes reactivos comprenden ACG y PRL radioactivados con isótopos diferentes.

5.

Otros objetos, características y ventajas del presente invento resultarán evidentes en el curso de la descripción detallada del mismo que sigue, tomando como referencia el dibujo adjunto.

10.

La Fig. 1 es una linealización de un diagrama lógico de la respuesta de inhibición competitiva del radio análisis de receptor de HCG, que sirve como norma de cálculo para el método del presente invento.

15.

La Fig., 2 ilustra el resultado del ordenador de la transformación del diagrama lógico de la norma para el radioanálisis de receptor de HCG; y

20.

La Fig. 3 es una comparación de los niveles de plasma de la HCG durante dos embarazos normales (HD, RS) y un embarazo intrauterino normal inducido en S.L. con niveles de HCG en diez pacientes con embarazo ectópico.

25.

Según el presente invento, se ha descubierto un procedimiento nuevo y muy específico para determinar la gonadotropina coriónica humana hormonal (HCG) y/o prolactina (PRL). Al contrario que en las pruebas giológicas anteriores de la HCG que han demostrado no ser muy prácticas y al contrario que las pruebas inmunoquímicas desarrolladas más recientemente, que se basan en el principio de la fijación de antígeno-anticuerpo pero que no son suficientemente fijables, el método del invento se basa en el empleo de un receptor altamente selectivo para HCG. El receptor se aísla del tejido idóneo de un

30.

animal apropiado, mientras que cuando se trata de los métodos inmunoquímicos, se produce un antisuero de la sangre de un animal apropiado que se ha inyectado con la hormona para producir respuesta antígeno-anticuerpo.

5. Antes del presente invento no existía razón conocida para determinar la PRL en seres humanos y, por lo tanto, no se hizo incapié en idear procedimientos apropiados. El invento se basa en el descubrimiento de un receptor específico para esta hormona. El empleo de un receptor específico aislado del
10. tejido idóneo de un animal que posee este receptor específico resuelve, aparentemente por completo, el inconveniente de las respuestas no específicas que suelen ocurrir con los procedimientos inmunoquímicos. En la mayoría de los casos la fijación del receptor específico exige la configuración natural
15. de una hormona en su forma biológicamente activa. Por consiguiente, cuando el procedimiento de prueba química en receptor se combina con técnicas de indicación por radioanálisis, el resultado es un procedimiento de radioanálisis de receptor que posee el grado de sensibilidad de las técnicas de radioinmu-
20. noanálisis y, al mismo tiempo, el grado de especificidad del bioanálisis y, por lo tanto, este procedimiento evidencia una mayor precisión que todas las pruebas de hormonas inmunológicas y biológicas existentes, particularmente pruebas de embarazo.
25. Además, como el receptor exige la forma biológicamente activa de la hormona para la fijación, la síntesis endógena de una HCG metabólicamente defectuosa, que normalmente produciría una reacción positiva de acuerdo con los procedimientos de pruebas inmunoquímicas pero que se suponen capaz
30. de mantener el embarazo, no daría lugar a una prueba falsa

positiva según el método de prueba del presente invento.

5. Según se ha indicado en la introducción, se ha sugerido que la prolactina hormonal ejerce una cierta función en el ciclo del estro de la rata, pero al mismo tiempo no se ha identificado en el sentido de que pudiera ejercer papel alguno en los procesos de ovulación o reproductivos de los seres humanos. Como base para este invento, se ha descubierto que durante el embarazo se produce un aumento en el nivel de PRL en la mujer. Además, se ha descubierto que el tejido de los ovarios de diversas especies, incluyendo las vacas y seres humanos, contiene lugares receptores específicos para la hormona PRL, además de lugares receptores para la hormona HCG.

10. Por lo tanto, además de proporcionar un procedimiento generalmente aplicable para determinar PRL junto con las diversas enfermedades mencionadas anteriormente, se pueden también emplear el procedimiento del invento para determinar, o ayudar preferiblemente en la determinación del embarazo. Un aumento detectado en el nivel de PRL en una mujer que se supone embarazada dá una indicación adicional, junto con la determinación de HCG según el invento, de que existe de hecho embarazo. Este mayor grado de confirmación es de gran valor, particularmente en aquellos casos que comprenden un embarazo anormal o aborto en potencia. Se cree que la PRL juega un importante papel en el desarrollo fetal y, por consiguiente, su determinación ofrece información adicional a la obtenida por una determinación de HCG. En un aspecto de preferencia del presente invento, se puede determinar simultáneamente la HCG y PRL, puesto que se ha averiguado que el mismo receptor posee lugares receptores para ambas hormonas. Este descubrimiento ha sido un descubrimiento particularmente inesperado en vista del hecho de que los

15.

20.

25.

30.

lugares receptores para la hormona PRL no se han confirmado con anterioridad a este invento en el corpus luteum de ningún animal y los lugares receptores para la HCG se han demostrado solamente en la rata. La detección simultánea ofrece evidentes ventajas en las pruebas de embarazo en vista del papel indicado anteriormente que juega la PRL en el embarazo. Una sola muestra de fluido corporal y un solo procedimiento de prueba proporciona la indicación más completa y precisa de embarazo de la que se puede disponer.

5. Esta técnica de determinación simultánea no queda limitada a las hormonas HCG y PRL. Por ejemplo, se sabe que el tejido mamario contiene lugares receptores para más de una hormona, v.g., estrógeno, prolactina y oxidocina y, por lo tanto, la técnica del invento tiene igual aplicación a determinaciones simultáneas de dichas hormonas empleando un receptor derivado del tejido en las glándulas mamarias.

10. Se ha descubierto también, según el presente invento, que la técnica de radioanálisis de receptor permite la detección del embarazo a partir de una semana siguiente a la ovulación. Esto representa un avance notable en el campo de las pruebas de diagnóstico del embarazo puesto que, con anterioridad, el estado de embarazo no podía detectarse tan pronto y solamente se podía determinar al cabo del décimo o duodécimo días siguientes a la ovulación. Este resultado es más importante cuando se comprende la vasta mayoría de pruebas del embarazo se llevan a cabo hoy día no por medio del procedimiento de radioinmunoanálisis que permite la determinación al cabo de 10 ó 12 días siguientes a la ovulación, sino por medio de las pruebas de emaglutinación o del latex, que, según se ha indicado anteriormente, permite una determinación del embarazo tan solo después de 25 ó 30 días siguientes

a la ovulación. Las pruebas de radioinmunoanálisis exigen por lo menos 24 horas de tiempo de laboratorio y normalmente unas 48 horas de tiempo de ensayo, junto con procedimientos molestos y costosos para preparar anticuerpo o antisuero suficientemente específico. Por otro lado, el tiempo necesario para llevar a cabo el procedimiento de la prueba según el presente invento no lleva más de una hora y, normalmente, tan solo una media hora. Las ventajas prácticas que se derivan de dicho método de prueba de embarazo, que permite la determinación del estado de embarazo antes de la implantación del óvulo fertilizado en el tejido endometrial, se han expuesto brevemente con anterioridad, y dichas ventajas así como los importantes beneficios en lo que se refiere a investigación básica en el campo de la reproducción humana resultantes del presente invento resultarán evidentes a los expertos en la materia.

En vista de las similitudes fundamentales en el mecanismo de fijación del método de pruebas químico en receptor del presente invento y el mecanismo de la prueba inmunológica bien conocida, se puede utilizar los mecanismos de indicación desarrollados con anterioridad a este invento dentro del contexto del presente invento.

Por consiguiente, el sistema indicador puede consistir en una materia indicadora que se haya tratado con HCG de forma, que, en presencia del receptor, la materia indicadora se decolore, tome color, se aglutine, se precipite o dé otra indicación visible o química de la presencia o ausencia de HCG en la muestra acuosa del fluido corporal en ensayo. No obstante, por lo expuesto anteriormente, es evidente que los resultados más eficaces se obtienen cuando se

5. emplea una técnica de análisis radiológico como sistema indicador. Por consiguiente, la modalidad de radioanálisis en receptor del presente invento representa evidentemente la modalidad de mayor preferencia. A pesar de todo se comprenderá que el presente invento no consiste en la provisión de un sistema de indicación particular para utilizarse con el método en cuestión, sino además el empleo fundamental y de novedad de las técnicas químicas en receptor y un receptor específico para determinar la presencia de HCG y/o PRL.

10. En vista del grado notable de especificidad y sensibilidad al método de radioanálisis de receptor del presente invento, se puede hacer una determinación satisfactoria en una muestra extremadamente pequeña. Por ejemplo, empleando el procedimiento del presente invento como prueba del embarazo, se puede realizar la prueba utilizando tan solo

15. aproximadamente 0,1 cc o menos de sangre tomada de la paciente. Esta extracción de la paciente se puede realizar por medio de un diminuto pinchazo en la yema de un dedo. Además, el método del invento es eficaz para determinar la presencia de HCG en cualquier muestra acuosa y, por consiguiente,

20. se puede emplear suero de la sangre o una muestra de orina de una paciente. El receptor específico empleado en el procedimiento de prueba según el presente invento, se deriva del tejido del ovario. Según se ha indicado anteriormente,

25. el receptor es sensiblemente más selectivo para HCG y materias semejantes a la HCH, o PRL, que lo es en anticuerpo de HCG o PRL, puesto que el receptor exige la configuración

30. vativa de la hormona en su forma biológicamente activa para la fijación. Por lo tanto, no hay posibilidad de respuesta inmune no específica. En todos los animales que poseen

este receptor específico, es fácilmente detectable en el tejido del ovario, que representa el tejido idóneo de la hormona. A pesar de que el receptor se puede aislar de cualquier animal mamífero y posiblemente de ciertos animales no mamíferos, es preferible obtener el receptor de los ovarios de animales relativamente grandes, como son las vacas, ovejas, cerdas, yeguas y similares en vista del hecho de que estos animales tienen una cantidad proporcionalmente mayor de tejido del ovario y, por lo tanto, existe un suministro disponible de dicho tejido gracias al hecho de que estos animales se sacrifican a escala industrial por su carne. Se ha determinado que se pueden realizar hasta 200 pruebas de embarazo de un solo ovario de vaca. Los ovarios, por ejemplo de las ratas, son tan pequeños que hace que sea prácticamente desaconsejable el empleo de animales de este tipo como fuente de receptor. Según se expondrá más adelante, el método de prueba del invento tiene también aplicación a animales que posean el receptor y, por lo tanto, la evaluación positiva del embarazo en una especie dada ofrece también un método para clasificar animales con relación a la presencia del receptor.

El animal del que se obtiene el receptor, habrá de estar preferiblemente en estado de preñez en el momento de sacrificarlo puesto que en ese periodo la cantidad de tejido del ovario y el número de lugares receptores alcanza un punto máximo. Se ha demostrado que el primer trimestre de preñez es el periodo más conveniente para obtener el tejido.

El receptor específico del invento se obtiene por separación de membranas de plasma puro procedentes del tejido del ovario seguido de evaluación de las diversas frac-

5. ciones de la membrana del plasma ensayando contra HCG o PRL irradiadas isotópicamente y eligiendo la fracción que muestra la máxima fijación de la hormona. El receptor es extraordinariamente estable y se puede conservar durante un largo periodo de tiempo, o aún se puede reutilizar en un segundo procedimiento de prueba o en una prueba ulterior. El receptor de la membrana del plasma es estable después liofilización para la prueba del embarazo. El procedimiento exacto para obtener el receptor se describirá con mas detalle más adelante.

10. Como el procedimiento de prueba del invento no es específico de una especie, se puede utilizar para detectar preñez en cualquiera de los animales que han demostrado poseer el receptor específico del invento. Así, aunque el receptor es muy específico para la hormona HCG en seres humanos y LH en seres humanos y animales, puede también finar de una forma selectiva proteínas del tipo de la HCG que juegan en los animales un papel correspondiente a la HCG en los seres humanos, v.g., corresponden a las gonadotropinas coriónicas en los seres humanos. Lo mismo ocurre con PRL. La ventaja es que puede experimentar animales de ensayo de laboratorio normales, como son los monos, perros, conejos, ratones, etc., por este método, mientras que se necesitan anticuerpos por separado para cada animal según los procedimientos de pruebas inmunoquímicas.

20. La irradiación de HCG o PRL con un isótopo radioactivo se puede efectuar de una manera normal, eligiéndose un isótopo apropiado para esta finalidad, por ejemplo, de I^{131} , C^{14} , H^3 y similar. Un isótopo particularmente apropiado es un isótopo radioactivo de yodo como el I^{125} , en vista del

30.

hecho de que la irradiación con este isótopo es relativamente sencilla y muchos laboratorios tienen el equipo necesario para medir este isótopo.

5. Cuando se trata de determinación simultánea de hormonas por la técnica de análisis de receptor del invento, es necesario radioactivar cada hormona que se desea determinar con un isótopo distinguible, con el fin de que la medición de la hormona fijada y/o la hormona sin fijar proporcione una indicación separada por cada hormona que se desee determinar.

10. Por ejemplo, cuando se realiza una determinación simultánea de HCG y PRL se pueden radioactivar muestras purificadas de estas dos hormonas con I^{125} e I^{131} , respectivamente, y se pueden utilizar dispositivos contadores fácilmente disponibles para contar por separado cada isótopo.

15. Para describir de una forma más completa el presente invento, se presentan varios métodos específicos para preparar reactivos de ensayo y la aplicación de radioanálisis de receptor así como ejemplos específicos de determinaciones clínicas utilizando el presente invento, debiéndose comprender que los procedimientos específicos son solamente ilustrativos y en sentido alguno limitativos.

20.

1. Irradiación Radioisotópica de la Hormona

Se utilizó HCG muy purificada (que contenía 12.000 I.U./mg. para la prueba. La HCG se radioactivó con I^{125} empleando lactoperoxidasa preparada a partir de leche (RZ = 0,78; Sigma Company, St-Louis, Missouri). Dos mci de I^{125} en 20 ul de tampón de acetato sódico 0,1 M con un pH de 6,0 se mezclaron con 25 microgramos de HCG en un vaso de reacción. Una cantidad alícuota de 50 ng de lactoperoxidasa en 20 ul, y 200 ng de H_2O_2 en 10 ul, de agua se añaden

25.

30.

- dieron entonces el vaso. Se añadieron tres partes alícuotas de 100 ng, de H₂O₂ a intervalos de cinco minutos. Al final del periodo de 20 minutos, la reacción se detuvo añadiendo 0,5 cc de NaCl de 0,15 M que contenía un 1% de albúmina de suero de un animal bovino (BSA) con un pH de 7,0. La hormona radioactivada se separó entonces del yodo libre por filtración en gel en una columna de 1 x 30 cm de Sephadex G-100 equilibrada con NaCl de 0,15 M que contenía 1% de BSA, pH 7,0. Se determinó la actividad específica de la HCG radioactivada por precipitación con ácido tricloroacético. Se diluyeron 5 microlitros de la mezcla de reacción cruda a 5 cc con tampón de fosfato de 0,05 M de pH 7,5 que contenía 0,1% BSA. A una parte alícuota de 200 ul de esta solución se añadieron 400 ul de ácido tricloroacético hasta una concentración final del 10% de ácido tricloroacético. Las proteínas precipitadas se recuperaron por centrifugación. La radioactividad asociada con el material precipitable se consideró como proteína fijada y se utilizó en el cálculo de la actividad específica de la hormona radioactivada. La mezcla de radiación cruda se purificó por filtración en gel a través de una columna de 1 x 30 cm de Sephadex G-50 equilibrada con 1% BSA en 0,9 NaCl. La actividad específica de la HCG empleada en el radioanálisis de receptor era 20-30 uCi/ug. La actividad biológica de la HCG radioactivada empleada en la prueba, determinada por análisis de agotamiento de ácido ascórbico del ovario, era de 8923 I.U. /mg, con límites de confianza del 95% de 5826-12250 I.U./mg.

- Se yodó HPRL por el método de Hunter y Greenwood con pequeñas modificaciones: a 50 ul de tampón de fosfato 0,5 M, pH 7,5 se añadió 1 mCi de Na I¹²⁵ (New England Nu-

5. clear, Boston, Massachusetts) 5 ug hPRL, y 70 ug de cloramina -T, seguido al cabo de 15 minutos por metabisulfito sódico. Se añadieron 100 mg de glóbulos de yodo (Hycel Reagents, Houston, Texas) a la mezcla yodada cruda para absorber I^{125} sin reaccionar. También se yodó hPRL de una forma encimática mediante lactoperoxidasa (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri). Se consiguió la purificación por filtración en gel sobre una columna Sephadex G-100 (0,7 x 18 cm). La actividad específica y pureza de la PRL radioactivada se determinaron por cromatoelectroforesis. Se utilizó hPRL I^{125} capaz de fijarse específicamente al tejido de las glándulas mamarias de ratas lactantes para los estudios de fijación con homogenado de ovario parcialmente purificado.

II Preparación del Receptor

15. Todos los procedimientos en la preparación de las membranas de plasma se llevaron a cabo en un baño de hielo o a 4°C. Se obtuvieron ovarios frescos de ganado bovino en estado inicial de preñez (primer trimestre): longitud del feto de la corona a la rabadilla hasta 22 cm) del animal sacrificado y se conservó en nitrógeno líquido hasta la elaboración. En un experimento típico, se cortaron en pequeños trozos 100 gramos de tejido de aproximadamente 25 corpora lútea grandes empleando una cuchilla de acero afilada y se molió en 500 cc de tri-HCl de 10 mM., pH7,8, que contenía un mM de $MgCl_2$, un mM ditiotreitól, 10.000 I.U. de Trasylol (FBA Pharmaceuticals) por litro y 0,25 M sacarosa. El homogenado se filtró a través de dos capas de gasa y las partículas de mayor tamaño se volvieron a elaborar en 500 cc del tampón. El tejido se hizo más homogéneo en 10 a 15 pasadas en un homogenizador de teflón-vídrío, tipo C con una holgura de
- 20.
- 25.
- 30.

- 0,12 a 0,17 mm a 4°C. El homogenado se centrifugó a 650 xg durante 20 minutos en una centrifugadora refrigerada Sorvall (RC B, Toro GSA) para separar células intactas, residuos celulares y núcleos. El sobrenadante de 650xg se centrifugó de nuevo a 13.000 g durante 20 minutos en la misma centrifugadora. El sobrenadante se tiró esta vez y el nódulo se volvió a suspender en 50 a 70 cc del tamón tri-HCL con ayuda del homogenizador de Teflón-vidrio. Esta suspensión se inyectó en el núcleo del rotor zonal TI-14 (modelo Beckman Spinco L3-50) haciéndolo girar a 3000 rpm y que contenía 500 cc de gradiente de sacarosa lineal (bomba LKB Ultrograd 11.300) desde 30% (peso/volumen) hasta 50% (peso/volumen) sacarosa y 1200 cc de amortiguador de 50% (peso/volumen) sacarosa (régimen de bombeo 20 cc/minut). Se inyectó una sobrecapa de 20 cc después de la muestra. Al cabo de dos horas de centrifugación a 45.000 rpm, la centrifugadora se deceleró y el contenido del rotor se desplazó con sacarosa al 55% a razón de 20 cc/minuto. Las membranas del plasma se desplazaron del rotor con el fin de aumentar el tamaño de partícula, y se recogieron fracciones de 12cc inmediatamente se congelaron hasta su análisis para hallar la actividad de fijación y actividad enzimática. Las membranas se mantuvieron congeladas durante tres meses sin aparente pérdida de capacidad de fijación. Se tomaron partes alícuotas de las fracciones para observación al microscopio electrónico antes de la congelación. La sacarosa obtenida en la suspensión no perturbaba la fijación de la HCG radioactivada.

Unas partes alícuotas de homogenado de ovario y partes alícuotas apropiadas de diversas fracciones obtenidas del gradiente de densidad continua de sacarosa se solubi-

30.

- lizaron en NaOH 1 M que contenía 0,1% dodecilsulfato sódico para determinar el contenido proteínico por el método de Lowry (J.Biol., Chem., Volumen 193 página 265, 1951) empleando albúmina del suero de animales bovinos como norma. Se combinaron también partes alícuotas de diversas fracciones con HCG radioactivado con I^{125} y se midió en cada caso el grado de fijación. Sobre la base de la concentración proteínica, las membranas de plasma que contenían el receptor específico para la HCG radioactivada mostraban 10 veces más de fijación que el homogenado de ovario en crudo. Cada fracción se analizó también para hallar la contaminación investigando su actividad enzimática. Cada función se analizó para hallar la actividad de 5'Nucleodiasa por el método de Sog et al., (J.Biol., Chem., volumen 262 página 694, 1967) y se midió el fosfato inorgánico liberado por el método de Fiske et al (J. Biol., Chem., vol. 66 página 375, 1925). Se analizó reductasa Cytochrome C. según el método de Cooperstein et al (J. Biol., Chem., volumen 189, página 665, 1951).
- Como modificación adicional respecto a la pureza de las membranas del plasma, se sometieron fracciones individuales a observaciones microscópico electrónico. Una parte alícuota de cada fracción proteínica se mezcló por espacio de 4 horas en tampón de 6,25 glutraraldehydo en 0,067 M cacodilato de pH 7,3. Las muestras se lavaron durante 5 minutos en cacodilato 0,25 M helado o tampón de fosfato que contenía $1\% OsO_4$ de pH 7,3 por espacio de 2 horas. Ulteriormente todas las muestras se desidrataron haciéndolas pasar a través de una serie clasificada de alcohol y se empotraron en Epon o Araldite. Se cortaron secciones de 0,06-0,09 μm y se decoloraron en una solución de acetato de uranilo acuoso al

4% y se fotografiaron en un microscopio electrónico Phillips Em-300.

5. Una fracción que mostraba la máxima fijación con la HCG radioactivada, una baja actividad enzimática y que contenía membrana de plasma puras según se pudo demostrar con el microscopio electrónico, se eluyó a una densidad de sacaro-
sa de 1,16 (ca 35% peso/volumen). Se conservaron partes ali-
cuotas apropiadas de esta fracción en nitrógeno líquido y se emplearon como receptor.

10. III. Procedimiento de Radianálisis de Receptor

Se realizó el radioanálisis de receptor en tubos de polistireno de 10x 75 cc según las indicaciones normati-
vas expuestas en la tabla I.

TABLA I

15.	Muestra	Diluyente ¹	Proteína de la membrana del plasma: 40 ug	HCG ² I ¹²⁵
	testigo	100 ul	100 ul	100 ul
	HCG ³ (ng/ml)			
	3.0	100 ul	100 ul	100 ul
20.	6.2	100 ul	100 ul	100 ul
	12.5	100 ul	100 ul	100 ul
	25.0	100 ul	100 ul	100 ul
	50.0	100 ul	100 ul	100 ul
	100.0	100 ul	100 ul	100 ul
25.	Plasma (dil. 1:2 to 1:50)	100 ul	100 ul	100 ul

¹Tampón de Tris-HCl de 10 mM con pH 7,2 conteniendo 0,1%

BSA, CaCl₂ de 1 mM y 20 I.U. Trasylol por tubo.

²Aproximadamente (1,5 ng = 50.000 cpm).

30. ³12.000 I.U. por mg (7).

La normativa para el radioanálisis de receptor simultáneo de hPRL y hCG se indica en la tabla la.

TABLA la

5.	Hormona sin Radioactivar ¹		Membranas de Plasma ²	Hormona Radioactivada ³		Plasma de Control ⁴
	hPRL	hCG		hPRL I ¹²⁵	hCG I ¹³¹	
	100 ul ⁵	100 ul ⁵	100 ul	100 ul	100 ul	50 ul
	100.0	0.2	↓	↓	↓	
10.	50.0	0.4				
	25.0	0.8				
	25.5	1.6				
	6.3	3.2				
	3.2	6.3				
15.	1.6	12.5				
	0.8	25.0				
	0.4	50.0				
	0.2	100.0				

20. ¹Dilución duplicadora comenzando a 100 ng en 100 ul en tampón de incubación.

²Aproximadamente 100 g proteína de membrana de plasma aisladas de corpora lutea de vacas preñadas.

³hPRL I¹²⁵ (60-70,000 cpm/tubo) y hCG I¹³¹ (25-30.000 cpm/tubo) elaboradas en tampón de incubación.

25. ⁴Plasma de sujetos completamente hipofisectomizados que mostraban niveles no detectables de hPRL y hLH en radioinmunoanálisis respectivos.

Tampón de incubación: tampón de tri HCL 10 mM pH 7,2, conteniendo MgCl₂ 1 mM, CaCl₂, 0,1% (peso/volumen) BSA, y 50 I.U. de Trasylol.

30. En la Tabla I, la incubación se realizó por espacio de 30 minutos a 37°C en un agitador de baño de agua Duna-

- boff. Se añadió entonces un cc de diluyente helado. El contenido de los tubos se mezcló en una mezcladora Vordex y se centrifugó por espacio de 20 minutos a 3000 xg en una centrifugadora refrigerada Sorvall (modelo RC2B, tipo de rotor HS-4).
5. Los sobrenadantes se aspiraron y los nódulos se contaron en un contador Packard Autogamma con un 51% de eficacia respecto a I^{125} . Las curvas normales y la concentración hormonal en las muestras de plasma se calcularon mediante un ordenador IBM compartidor de tiempo empleando transformaciones logit-log.
10. Una linealización logit-log de la respuesta de inhibición competitiva de radioanálisis de receptor de HCG se indica en la Fig. de los dibujos adjuntos. La sensibilidad del análisis era inferior a 3,0 ng/cc con una precisión de $\pm 10\%$. Las variaciones intra e interanálisis, determinadas analizando un depósito de plasma a diversas diluciones en 20 análisis, fueron de $\pm 5\%$ y $\pm 15\%$ respectivamente, en toda la escala del análisis, proporcionando de este modo evidencia de la alta capacidad de reproducción del análisis.
15. La muestra de plasma de una mujer embarazada mostraba una respuesta a la dosis idéntica a la norma HCG, confirmando la validez del análisis. Se produjo una total carencia de interreacción con preparaciones altamente purificadas de FSH, PRL y HPL, así como plasma de sujetos hipotiroidales, acromegálicos y mujeres durante la lactancia por parto,
20. indicando de este modo una elevada especificidad del radioanálisis de receptor. El radioanálisis del receptor no discriminaba entre HCG y LH; no obstante, un radioinmunoanálisis empleando FSH, LH y HCG radiactivadas con I^{125} y anticuerpos a sus subunidades beta específicas hormonales
- 25.
- 30.

han demostrado que no se produce una elevación en los niveles de plasma de LH y FSH durante el inicio del embarazo. Por lo tanto, una falta de discriminación entre HCG y LH no afecta la detección del embarazo cuando se utiliza el radioanálisis del receptor.

5.

Fijación de hPRL I¹²⁵ al Homogenado de Ovario.

Una mezcla de reacción que contenía 100 ul de tampón de incubación conteniendo 10 IU Trasylol (FBA Pharmaceuticals, New York, New York), 50 ul de preparación de receptor equivalente a 1-300 ug de proteína y 100 ul de hPRL I¹²⁵ (SA; 50-70 uCi/ug) se incubó a 37°C por espacio de 2 horas en ausencia y en presencia de un microgramo de PRL sin irradiar procedente de un animal vacuno. Al final de la incubación, se añadió un cc de tampón helado en todos los tubos y los tubos se centrifugaron a 5000 rpm durante 20 minutos. Se aspiraron los sobrenadantes. Los nódulos que contenían hormonas fijadas al receptor se contaron en un contador Automamma con un 51% de eficacia respecto a I¹²⁵ (Packard Instrument Company, Downers Grove, Illinois). La fijación específica se calculó con la diferencia de fijación en los tubos con y sin PRL sin radioactivar. La fijación específica de hPRL I¹²⁵ a la membrana del plasma procedente de corpora lutea de animales bovinos era un procedimiento saturable. La saturación se demostró por incubación de membrana de plasma procedente de corpora lutea de animales bovinos (150 ug de proteína) a 37°C por espacio de dos horas en 250 ul con concentración variable de hPRL y I¹²⁵. La capacidad de fijación/mg de proteína y Kd calculado por análisis de Scatchard de datos obtenidos a partir de la curva de saturación era de $1,4 \times 10^{-13}$ m y $Kd = 1,4 \times 10^{-12}$.

10.

15.

20.

25.

30.

La fijación específica de hPRL I¹²⁵ homogenados

de ovario aumentó en función a la cantidad de homogenados añadidos y se inhibió añadiendo 1 ug de PRL sin radioactivar de animal bovino a las mezclas de incubación. Empleando 100 ug de homogenado, aproximadamente del 20 al 30% del hPRL I¹²⁵ se fijó en ausencia de PRL sin radioactivar.

5.

A 37°C, la fijación era rápida durante los primeros 30 minutos después, la fijación aumentó lentamente hasta alcanzar un equilibrio al cabo de 2 horas. A cero grados centígrados se observa poca fijación aún al cabo de 18 horas de incubación.

10.

Para demostrar la especificidad de la fijación de hPRL I¹²⁵ a homogenados de ovario hormona de desarrollo humano (hGH), hormona estimulante del folículo humano (hFSH), hormona luteinizante humana hLH), PRL de animal bovino (bPRL), PRL de animal ovino (oPRL), y somatomotropina coriónica humana (hCS),

15.

se incubaron a diversas concentraciones. No se observó desplazamiento de (hPRL) I¹²⁵ fijada para proteína receptora por hFSH y hLH. La hCS y la hGH podían desplazar hPRL I¹²⁵ fijada en receptor; no obstante, la potencia de la preparación hGH para desplazar hPRL I¹²⁵ fijada al receptor era aproximadamente de 0,5-1% de hPRL.

20.

Las preparaciones de PRL de animal bovino y animal ovino demostraron ser esencialmente de una potencia similar para competir con hPRL I¹²⁵. La falta de competición de FSH y LH con PRL para la fijación en el receptor demuestra la especificidad de la PRL para los lugares de

25.

receptor hCS, que eran similitudes estructurales y biológicas a la PRL demostrando una cierta interreacción; no obstante, la interreactividad de 0,5-1 observada con la preparación de hGH concuerda con la contaminación indicada de hGH en un grado muy similar.

30.

IV. Pruebas Clínicas

100 pacientes con retraso en la primera menstruación esperada y que eran candidatos en potencia para un aborto prematuro se les extrajo muestras de sangre para el radioanálisis en receptor y se recogió orina de 24 horas para la prueba de aglutinación (prueba Pregnosticon-Dri-Dot). Se valoraron el examen físico y pelvico, cambio en el tamaño del utero y consistencia, y otros síntomas de posible embarazo. Si el radioanálisis en receptor era positivo, tanto si la prueba pregnosticón era negativa, se realizó un miniaborto. Todas las muestras se enviaron al laboratorio patológico, para confirmar la presencia de embarazo. Tres pacientes abortaron espontáneamente, y tres que desarrollaron embarazo ectópico se expondrán por separado. Las muestras de sangre se centrifugaron a 2500 rpm a 40°C por espacio de 15 minutos y el plasma o suero se conservó a -20°C hasta el momento de la utilización.

El radioanálisis de rector para HCG en la sangre se efectuó 77 veces con 72 pacientes para determinar la presencia de gravidez prematura. La precisión de la prueba se determinó comparándola con la prueba Pregnosticón-Dri-Dot y la presencia de gravidez se confirmó por examen histopatológico de especímenes endometriales obtenidos en aborto electivo o espontáneo. Los criterios clínicos normales, por ejemplo, el útero en aumento o la iniciación de la menstruación, proporcionaron evidencia adicional confirmando la precisión del radioanálisis de receptor. 41 pacientes mostraron un radioanálisis de receptor negativo, y un resultado de Pregnosticon positivo falso se asoció con este grupo. Todas las 41 pacientes se confirmaron como nó embarazadas por observaciones clínicas adicionales.

En 14 casos de aborto, la diagnosis patológica del

tejido extraído confirmó el resultado del radioanálisis del receptor. Siete de los 14 miniabortos que demostraron tejido decidual o placentar, lo cual confirmaba embarazo, daban un radioanálisis de receptor positivo pero una prueba de Pregnostición negativa.

5.

La prueba de Pregnostición tampoco era suficientemente sensible para detectar los primeros síntomas de embarazo, mientras que el radioanálisis de receptor podía detectar un embarazo al cabo del cuarto día siguiente a la ovulación y demostró ser de gran valor en casos de aborto en potencia. Cuatro abortos prematuros en las primeras siete semanas de embarazo demostraron análisis en receptor positivos, pero al mismo tiempo prueba de Pregnostición negativa. Las pacientes abortaron en cada caso espontáneamente, y el contenido uterino se recuperó revelando un tejido coriónico. En los cuatro embarazos que determinaron el aborto espontáneo, las pacientes continuaron manchando por espacio de 10 a 14 días y el útero no se había agrandado suficientemente para la duración de la gravidez, lo cual sugería una anomalía en el crecimiento y desarrollo del embrión y la placenta.

10.

15.

20.

De 20 pacientes que visitaron la clínica de fertilidad se tomaron muestras de sangre a diario durante el ciclo menstrual para determinar la FSH y LH por radioinmunoanálisis. Tomando como base BBT, los niveles de plasma de FSH y LH, excreción urinaria de estrógeno y progesterona y cambios característicos en la mucosa cervical como evidencia de ovulación se aconsejó a estas mujeres que quedaran embarazadas. Las muestras de sangre de cuatro de estas mujeres que quedaron embarazadas se analizaron para establecer los niveles de HCG por el radioanálisis de receptor y los niveles de FSH y LH por

25.

30.

radioinmunoanálisis en el día de la ovulación y durante el primer periodo de embarazo. El día de la ovulación en estas cuatro mujeres embarazadas se confirmó ulteriormente por determinación de FSH y LH en la sangre. Se sometieron al experimento un total de 15 embarazos normales durante el periodo la evolución y los primeros días de embarazo. Un resumen de las pacientes sometidas a tratamiento se presenta en la tabla II.

TABLA II

	Número	Días siguientes a la falta de la Regla	Sangre para Radioanálisis de Receptor	Prueba de Aglutinación -Orina
	Miniabortos			
	3	8-11	+	+
	8	6-14	+	-
5.	5 *	1-11	-	-
	Embarazos Normales			
	8	14-33	+	+
	7	0-42	+	-
	Posibles Ectópicos			
20.	1	14	+	-
	1		-	-
	Aborto espontáneo			
	3'	5-17	+	-
	Sin embarazo			
25.	43	0-40	-	-
	1		-	+

* 5 Doblemente confirmados los no embarazos.

30. Lo que sigue son historiales adicionales que sirven para ilustrar aún más el valor de la técnica de radioaná-

lisis en receptor.

5. Una para III, grávida IV, de 23 años de edad se sometió a observación al cabo de los 8 días siguientes a la falta del periodo menstrual. La prueba de orina de Pregnosticón fué negativa y el radioanálisis del receptor fué positivo. Un miniaborto realizado al día siguiente demostró tejido placentar.

10. Una nuligrávida de 20 años de edad llevaba insertado un aparato intrauterino, y 9 meses después la menstruación se había retrasado 9 días; al radioanálisis receptor fué positivo. Este análisis fué de nuevo positivo al cabo de 9 días y un miniaborto reveló tejido coriónico. Dos pruebas de Prognesticón realizadas en los mismos días fueron negativas.

15. Una nuligrávida de 28 años de edad con un ciclo de 28 días tenía un retraso de 17 días en la menstruación; el radioanálisis de receptor era positivo y la prueba Prognesticón negativa. Varios días después se produjo un aborto espontáneo. Tres meses después se la observó de nuevo a los 5 días de la falta del primer periodo menstrual. De nuevo el radioanálisis de receptor era positivo y la prueba de Pregnosticón negativa. El útero no se desarrolló, comenzaron las manchas negras y persistieron hasta que se volvió a producir un aborto espontáneo al cabo de 4 semanas de la falta. El exámen del tejido del segundo aborto reveló un saco amniótico sin feto.

20. En otro caso, se observó una grávida de 1 de 30 años de edad a los 12 días de la falta del ciclo. En este caso el radioanálisis de receptor fué positivo y la prueba de Pregnosticón negativo. Al cabo de dos semanas de manchado irregular y agrandamiento uterino sospechoso, se produjo

25.

30.

aborto espontáneo.

5. En dos pacientes en las que se sospechaba embarazo ectópico una demostró un radioanálisis de receptor positivo y la otra una prueba negativa. Se confirmó que la primera tenía embarazo tubal sin ruptura. Ambas dieron pruebas de Pregnoticón negativas. Lo que sigue es un breve comentario del embarazo ectópico: una para 1, grávida 1 de 40 años de edad tuvo una falta de ciclo menstrual e inmediatamente después desarrolló un dolor abdominal inferior suave y indicio menstrual vaginal que persistió por espacio de dos semanas.

10. La prueba del tubo de inhibición de emaglutinación fué negativa al día siguiente de la admisión. El radioanálisis del receptor al segundo día fué positivo. Al tercer día, el "currettage" no reveló evidencia de embarazo; la punción de cul-de-sac fué negativa, la laparoscopia demostró ectópico izquierdo sin ruptura que se extrajo en una ulterior laparotomía.

15. Se admitieron 13 pacientes en el hospital debido a supuesto embarazo ectópico. El último periodo menstrual oscilaba entre 23 y 76 días antes de la admisión. Dolor abdominal inferior, amenorrea, frecuente manchado vaginal y masa adnexal fueron las evidencias normales. Se obtuvieron muestras de plasma decada paciente antes de la intervención quirúrgica y en un caso en cuatro días separados para el radioanálisis en receptor de HCG. Las pruebas normales de hemaglutinación o aglutinación de latex se realizaron sobre muestras de orina al mismo tiempo. Los resultados de las pruebas de embarazo y conclusiones patológicas se presentan en la tabla III. La tabla III indica los resultados obtenidos por el radioanálisis de receptor y la prueba de hemaglutinación en 13 supuestos embarazos ectópicos y, además, el tiempo desde la última

20.

25.

30.

menstruación y las conclusiones histológicas tubales. Siete de los 10 embarazos ectópicos daban un radioanálisis de receptor positivo, y una prueba de embarazo de hemaglutinación negativa. Se obtuvieron una prueba de hemaglutinación positiva falsa y ningún radioanálisis de receptor positivo falso. La gama de días de duración del embarazo era muy amplia puesto que comprendía entre 23 y 76 días después de la última falta del periodo.

TABLA III

10. COMPARACION DE PRUEBAS DE EMBARAZO Y CONCLUSIONES PATOLOGICAS EN 13 SUPUESTOS EMBARAZOS ECTOPICOS.

Radioanálisis en ceptor	Prueba de aglutinación	Embarazo ectópico tubal, patológica	Dias después de la última regla
(Número de pacientes)			
7 positivo	7 negativo	7 positivo	21,23,24,36 41,51,76
3 positivo	3 positivo	3 positivo	29,61,65
1 negativo	1 positivo	1 negativo	desconocido
2 negativo	2 negativo	2 negativo	30,48

20. La transformación logit-log de la curva normal de respuesta a la dosis de HCG daba una sensibilidad de 0,3 ng o 3 cc U/HGG/cc (Fig 2). En esta Fig. la TSH es la anotación del plasma procedente de pacientes hipotiróides; HGH, plasma de pacientes acromegálicos; PRL plasma de mujeres con lactación pos-parto.

25. Las unidades mIU del segundo preparado de referencia internacional equivalente a ng correspondientes de HCG se indican en la ordenada. Varias diluciones de la muestra de plasma procedente de una mujer embarazada dieron una pendiente paralela a la de

30.

la HCG indicando la validez del análisis. No se produjo interreacción con FSH, TSH, HGH y HPRL en el análisis. Se consiguió una recuperación del 98-102% de HCG añadida a las muestras de plasma de concentración hormonal conocida. La variación intraanálisis e interanálisis en los estimados de niveles hormonales de depósitos de plasma fué del 6% y el 11%, respectivamente. No obstante, el radioanálisis del receptor no discriminó entre LH y HCG. Este inconveniente se circumvino por las observaciones: (1) que ni la LH ni la FSH aumentan durante el primer periodo del embarazo según se puede determinar por radioinmunoanálisis de subunidad B específica de FSH, LH y HCG en la sangre; 2) que las normativas contienen la misma cantidad de plasma obtenida de mujeres no embarazadas durante la fase luteal conteniendo bajo niveles de LH; 3) que todas las muestras desconocidas se compararon con un depósito de plasma procedente de mujeres no embarazadas y varias diluciones de un depósito de plasma procedente de mujeres embarazadas analizadas de una forma rutinaria con cada análisis para un control de precisión y calidad; y 4) finalmente, que durante el primer periodo del embarazo los niveles de HCG-LH son dobles o triples que los niveles LH basal en las mujeres no embarazadas durante la fase luteal.

En la fig. 3, los niveles de HCG en 10 embarazos ectópicos se compararon con gravedad intrauterina normal en dos pacientes (H.D., R.S.) y una ovulación inducida y embarazo (S.L.) con 10.000 IU de HCG que se verificó con radioanálisis de receptor. Los niveles de plasma de la HCG durante el embarazo inducido o natural en su primer periodo fueron similares. El día del embarazo se basó en el último periodo menstrual indicado por las pacientes. En una de las 10 pacientes (A.....A), el

radioanálisis de receptor se realizón en los días 21, 24, 30 y 42 del embarazo. Los radioanálisis de receptor positivo en los días 21 y 24 se asociaron con pruebas Pregnostición negativas. El comienzo del aumento de HCG siguiente a un máximo de LH se detectó primero en muestras de sangre obtenidas primero en los días 6-8 siguientes a la ovulación y pudiera ser antes después de la fertilización. Tres de los embarazos ectópicos dieron análisis que se realizaron antes de la primera falta del periodo y los niveles de HCG en cuatro fueron del orden del embarazo normal. Los otros seis niveles de HCG ectópico fueron inferiores a lo normal. Estas observaciones sugerían que las nidaciones prepaturas en el tubo, antes de la ruptura y hemorragia, podrían segregar cantidades normales de HCG. No obstante, después, al producirse la hemorragia, aumentar la separación y reducirse el riego sanguíneo, la secreción de HCG se nivelaba.

Según se indica en la Fig. 3, en la presente serie de 13 embarazos ectópicos supuestos, la HCG era de 22 y 35 ng/cc o 0,26 y 0,42 IU, respectivamente, en dos de los trece casos. La detección de HCG a estos bajos niveles ayudó en el diagnóstico correcto de la paciente en los primeros momentos. Las restantes pacientes dan valores de > 100 ng/cc. Los niveles de HCG en los días 21, 24, 30 y 42 del embarazo (Fig. 3) se obtuvieron de la misma paciente. La prueba inicial se asoció con una prueba de Pregnostición negativa ; mientras que ambas pruebas fueron positivas en tres determinaciones ulteriores. En el día 64 fué necesaria intervención abdominal debido a un embarazo ectópico con ruptura.

El radioanálisis del receptor de HCG con una sensibilidad de 50 pg o 3 mIU/cc de plasma proporciona prácticamente

- una fiabilidad del 100% para determinar el embarazo después de la primera falta esta prueba realizada en una hora es ideal para el diagnóstico clínico de embarazo ectópico especialmente en pacientes que exigen intervención quirúrgica inmediata.
5. Trece pacientes con embarazo ectópico supuesto se sometieron al radioanálisis de receptor, y a una de ellas se la sometió a cuatro determinaciones por separado. Los resultados del análisis se compararon ulteriormente con los de las pruebas de embarazo de hemaglutinación, síntomas clínicos, y conclusiones
10. patológicas. Todas las pacientes se diagnosticaron con precisión por el radioanálisis de receptor, aún cuando las pruebas de hemaglutinación daban una indicación falsa de embarazo. Los niveles de HCG durante los embarazos ectópicos por este análisis son en general menores que los niveles durante un embarazo
15. ultrauterino normal; además, se puede conseguir un diagnóstico precoz (antes de la ruptura) del embarazo mucho antes que con las pruebas de hemaglutinación. Además, se puede excluir embarazo ectópico en pacientes admitidas en el hospital con emergencias abdominales agudas.
20. Describa suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.

REIVINDICACIONES

5. 1.- Procedimiento para la determinación de una hormona en una muestra acuosa, estando elegida dicha hormona del grupo que comprende la gonadotropina coriónica humana (HCG), hormona luteinizante (LH), prolactina hormonal (PRL) o materia similar a la HCG, caracterizado porque comprende las etapas de poner en contacto dicha muestra con un agente capaz de fijar de una forma selectiva dicha hormona, proporcionar un medio para indicar si dicha fijación ha tenido lugar y observar los
10. medios indicadores para determinar la presencia de la hormona en la muestra, y porque el agente capaz de fijar de una forma selectiva la hormona es un extracto de membrana de plasma procedente del corpus luteum de una especie que posee el receptor de gonadotropina coriónica humana o de la prolactina.
15. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dichos medios indicadores comprenden un dispositivo de medición de radioanálisis.
20. 3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque dicho dispositivo de medición de radioanálisis comprende la hormona a determinar irradiada radioisotópicamente.
25. 4.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque las fases de proporcionar y observar los medios indicadores comprenden poner en contacto el receptor y la muestra en presencia de la hormona a determinar irradiada radioisotópicamente, por lo que parte de dicha hormona irradiada y parte de la hormona sin irradiar, presentes en la muestra, se fijan al receptor; separar las hormonas fijadas al receptor de las hormonas sin fijar en dicha muestra acuosa, y medir la radioactividad de por lo menos el receptor separado o la
30. muestra acuosa, para determinar la concentración de la hormona

en función a la radiactividad medida.

5. 5.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque la hormona irradiada radioisotópicamente se radioactiva con un isótopo del grupo consistente en I^{125} , I^{131} , H^3 C^{14} .
- 6.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque la muestra es un fluido del cuerpo de una mujer que se supone en cinta o de un animal mamífero hembra.
10. 7.- Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque dicho fluido del cuerpo se elige entre el suero de la sangre o la orina.
- 8.- Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque dicho suero de la sangre se utiliza en cantidad de aproximadamente 0,1 cc.
15. 9.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el receptor se obtiene del corpus luteum de un mamífero.
- 10.- Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque el receptor se obtiene del corpus luteum de una vaca, una oveja, un cerdo o un caballo.
20. 11.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el receptor se obtiene por un método que comprende las fases de preparar tejido finamente dividido homogenado del tejido del corpus luteum, separar las membranas del plasma de dicho homogenado y elegir la fracción de la membrana del plasma capaz de fijar de una forma selectiva la hormona a determinar humana biológicamente activa.
25. 12.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el receptor se deriva de una mujer en cinta en el primer trimestre del embarazo.
- 30.

5. 13.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el agente reactivo para la determinación química por receptor de la hormona, comprende una forma virtualmente pura de la fracción específica del extracto de la membrana del plasma procedente del corpus luteum de una especie que posee el receptor para la hormona cuya fracción puede fijar de una forma selectiva la hormona biológicamente activa.

10. 14.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque los medios indicadores de la fijación de la hormona comprenden: un primer agente reactivo y un segundo agente reactivo; comprendiendo el primer agente reactivo, en forma virtualmente pura, la fracción específica del extracto de la membrana del plasma procedente del corpus luteum de una especie poseedora del receptor para la hormona a determinar capaz de fijar la hormona biológicamente activa; y comprendiendo dicho segundo agente reactivo hormona a determinar capaz de emitir radioación, estando destinado el primer agente reactivo a ponerse en contacto con la muestra que contiene la hormona que se desea medir y con el segundo agente reactivo para fijar parte de la hormona radiactivada y sin radioactivar a dicho receptor; y medios para medir la cantidad de hormona radiactivada fijada al receptor, estando la radiación emitida desde la misma en función a la concentración de la hormona en la muestra acuosa.

15. 15.- Procedimiento para la determinación simultánea de una pluralidad de hormonas en una sola muestra acuosa, tal y como queda sustancialmente descrita en la presente Memoria.

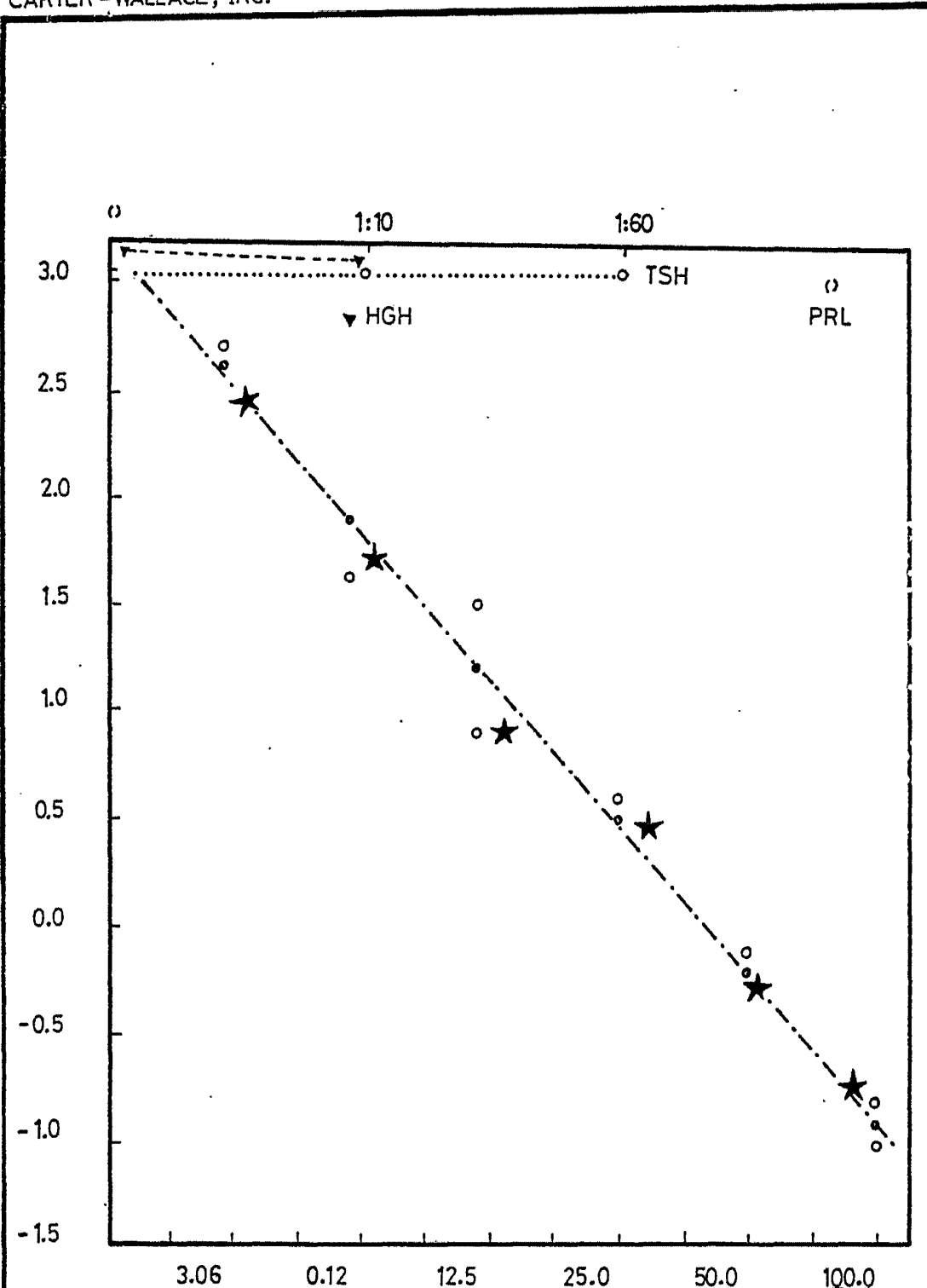
Esta Memoria consta de 44 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, - 1 JUN. 1977

CARTER-WALLACE, INC.

J. M. GÓMEZ AGUIRRE Y PARRAS
P. P. Firmado J. Suarez Diaz

30.



ESCALA VARIABLE

ESCALA VARIABLE.

Modelo - 1 JUN. 1957
J. M. B... FORDO
p. ...

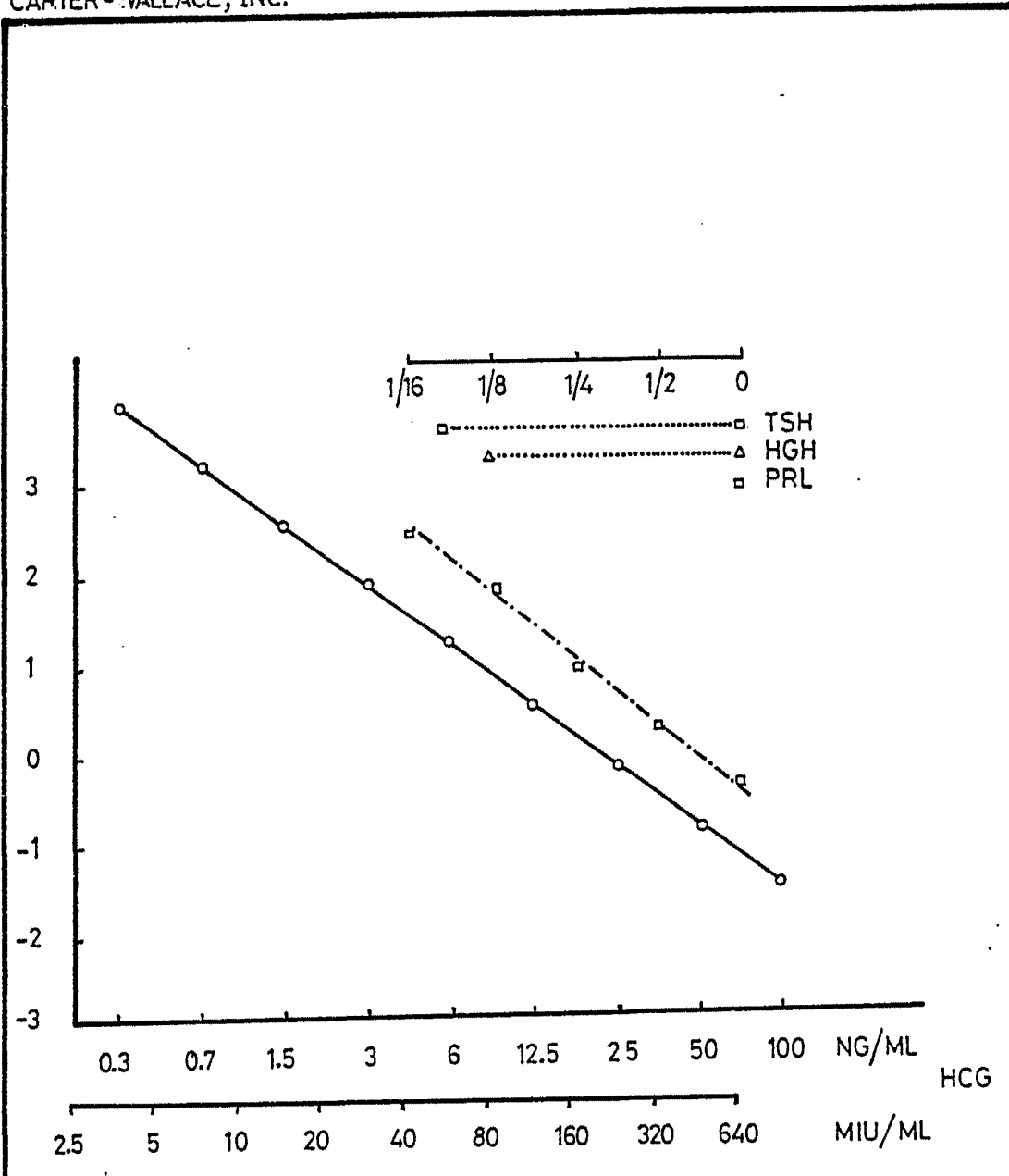


FIG. 2

ESCALA VARIABLE

Madrid - 1 JUN. 1977

ESCALA VARIABLE.

J. G. GOMEZ ACEBO Y PARRA

Dr. p. Firmador: J. Suarez Diaz

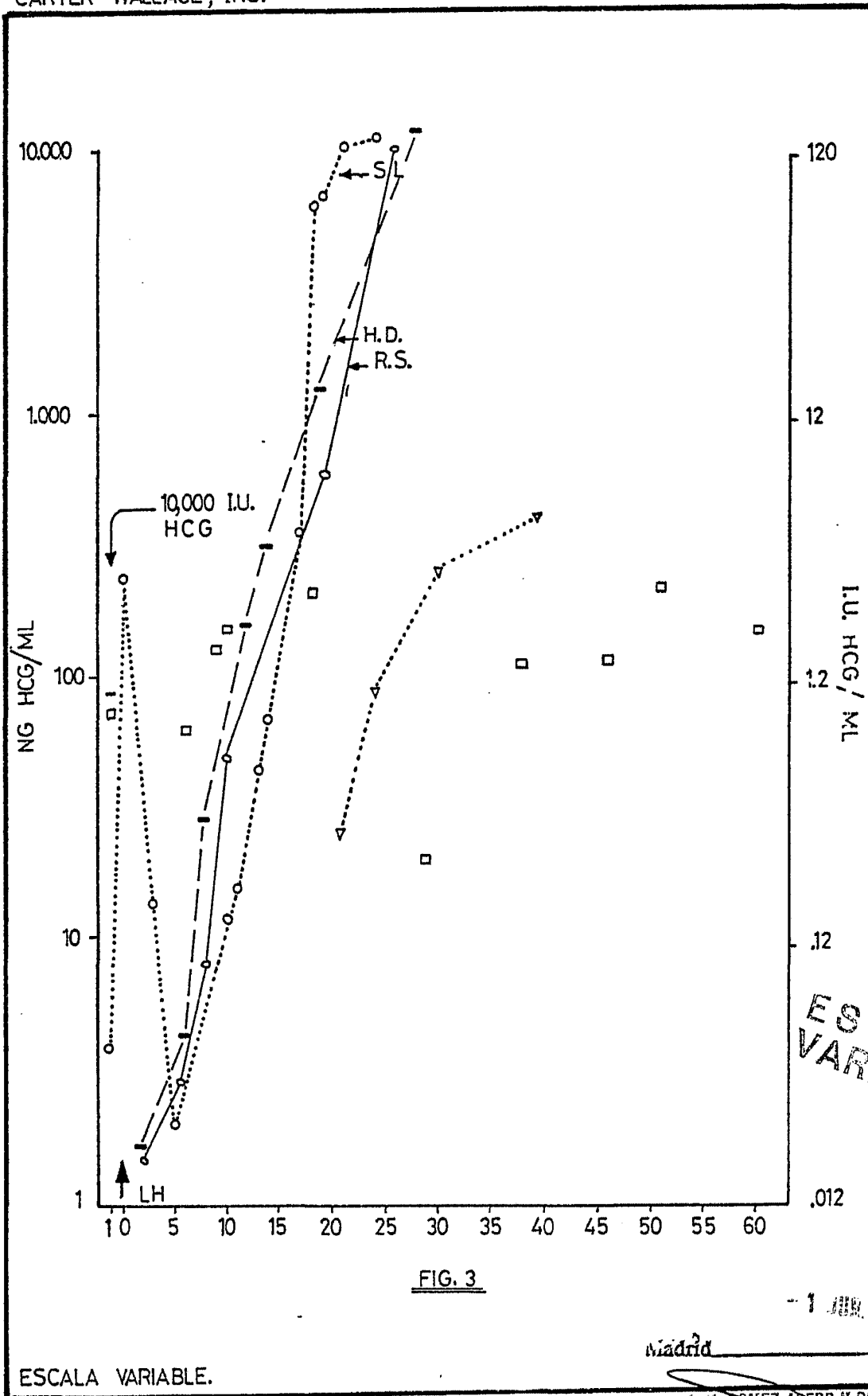


FIG. 3

1 JUN 1977

Madrid

ESCALA VARIABLE.

J. M. GÓMEZ ACERO Y POMBO
p. Firmado: J. Suarez Diaz

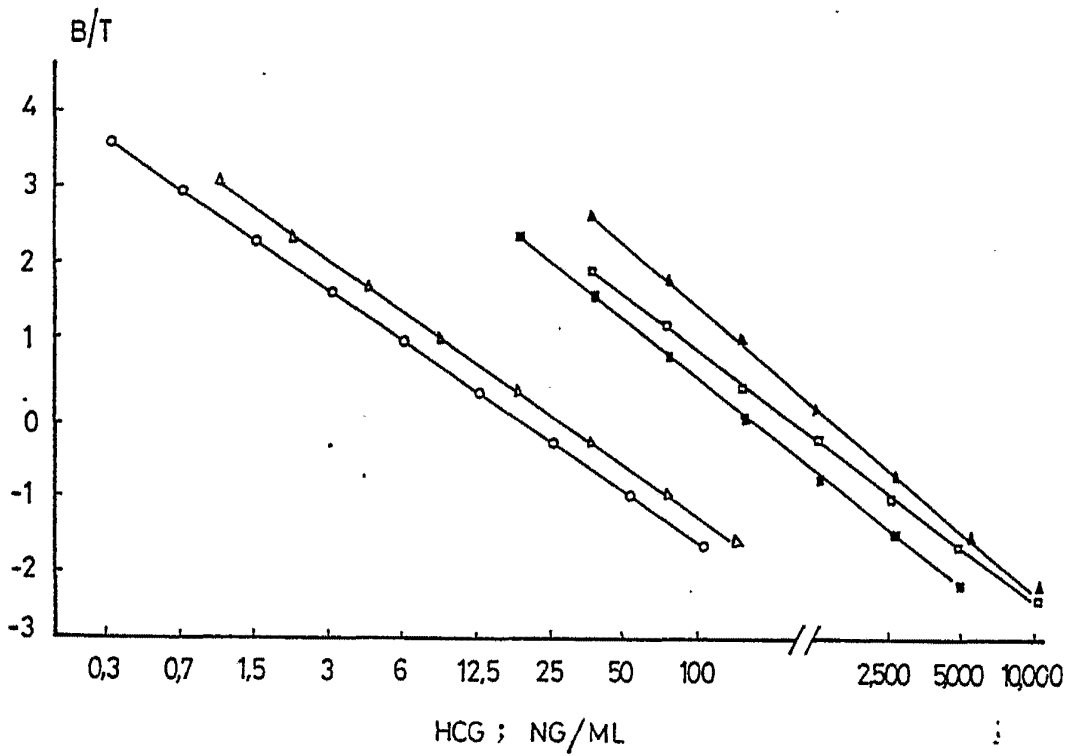


FIG. 3a

ESCALA
VARIABLE

- 1 JUN 1977

ESCALA VARIABLE.

LABORATORIO AGROPECUARIO Y FORESTAL
p. p. Firmado: J. Suarez