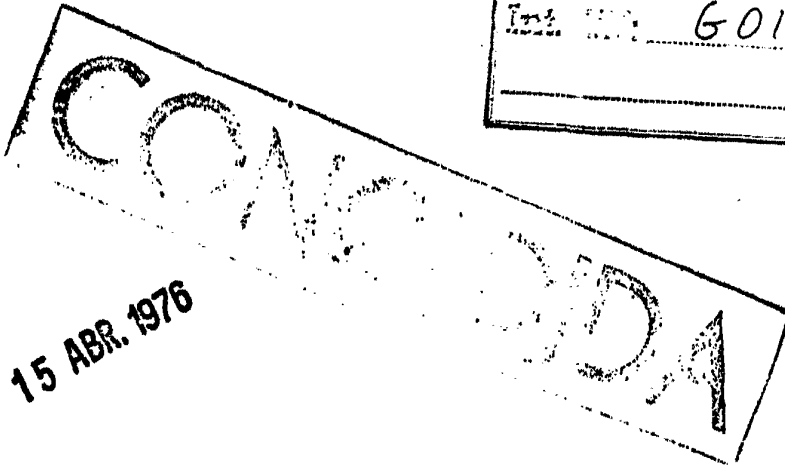


431413

Int. No. 601N



PATENTE DE INVENCION

5 Que por veinte años se solicita, a favor de BAXTER LABORATORIES, INC., de nacionalidad estadounidense, con domicilio en Morton Grove, Illinois (Estados Unidos), y que ha de recaer sobre "METODO PARA DETECTAR EN MUESTRAS DE PLASMA O SUERO SANGUINEO LA PRESENCIA DE PROTEINAS CAPACES DE ACTUAR COMO ANTIGENOS O ANTICUERPOS".

\*\*\*\*\*  
Memoria Descriptiva

10 El registro de la Patente de Invención que se solicita tiene por objeto garantizar la explotación exclusiva en todo el territorio nacional y sus posesiones de un método para detectar en muestras de plasma o suero sanguíneo la presencia de proteínas capaces de actuar como antígenos o anticuerpos, conforme se describe a continuación.

431413

Ambito de la invención

Esta invención se relaciona con un método de detección de sustancias (generalmente proteínas) capaces de actuar como antígenos o anticuerpos en muestras de plasma o suero sanguíneo. Más particularmente, la invención se relaciona con un método de detección de antígenos y anticuerpos asociados a la hepatitis. La invención utiliza técnicas de radioinmunoensayo o radioinmunológicas bien conocidas en el estado actual de la técnica. Estas técnicas pueden emplearse para detectar la presencia de una sustancia particular, por ejemplo un antígeno o anticuerpo, fijando un material radioactivo u otro marcador a un anticuerpo específico y midiendo luego la cantidad de tal anticuerpo marcado que se une o fija a un antígeno en fase sólida. En el caso de un anticuerpo radiactivamente marcado, midiendo la cantidad de emisiones radiactivas de la muestra desconocida y comparándolas con curvas patrones obtenidas con el uso de cantidades conocidas de antígeno, es posible determinar si una muestra de plasma o suero contiene un determinado antígeno o anticuerpo.

Muchas técnicas de radioinmunoensayo ya conocidas, empleadas para detectar la presencia de antígenos ó anticuerpos, incluyendo los asociados a la hepatitis, inmovilizan primeramente el anticuerpo fijándolo a una fase o sustrato sólido. Ejemplos de estas técnicas se describen en las siguientes referencias: patente estadounidense no 3.646.346, expedida a nombre de Kevin J. Catt el 29 de febrero de 1972; un artículo titulado "A Solid-Phase Radioimmunoassay for a Thermostable Adrenal-Specific Antigen" ("Radioinmunoensayo en Fase Sólida para un Antígeno Adre-

nal-Específico Termoestable"), de I.O. Auer, Y. Yagi, R. Kasukawa y F. Milgrom (Inst. Arch. Allergy, Vol. 42, páginas 816-825, recibido para su publicación el 15 de enero de 1972): y un artículo titulado "Prevalence of Hepatitis B Virus Antigen as Revealed by Direct Radioimmuno Assay with  $^{125}\text{I}$ -Antibody ("Preponderancia del Antígeno del Virus B de Hepatitis, Revelada mediante Radioinmunoensayo Directo con Anticuerpo  $^{125}\text{I}$ "), de C.M. Ling y L. R. Overby (The Journal of Immunology, Vol. 109, n° 4, octubre de 1972, páginas 834-841).

En contraste con las citadas técnicas anteriores, según la invención aquí descrita el antígeno va unido a los componentes de la fase sólida. Técnicas similares anteriores se han expuesto en los trabajos siguientes: en el artículo titulado "Rapid Micro-Radioimmunoassay for the Measurement of Antiviral Antibody" ("Micro Radioinmunoensayo Rápido para la Medición de un Anticuerpo Antiviral"), de Joel D. Rosenthal, Kozaburo Hayashi y Abner Louis Notkins (The Journal of Immunology, Vol. 109, n° 1, páginas 171-173, julio de 1972); en el titulado "Detection of Antibody to Hepatitis-Associated Antigen in Hemophilia Patients and in voluntary Blood Donors" ("Detección de Anticuerpos para Antígenos Asociados a la Hepatitis en Pacientes Hemofílicos y Donadores Voluntarios de Sangre"), de M.R. Peterson, L.F. Barker y D.S. Schade (Vox Sanguinis, Vol. 24, páginas 66-75, recibido para su publicación en marzo de 1972), y en el titulado "Sandwich' Solid Phase Radioimmunoassay for the Quantitative Determination of Human Immunoglobulins" ("Radioinmunoensayo en Fase Sólida 'Sandwich' para la Determinación Cuantitativa de Immunoglobu-

linas Humanas"), de Sydney E. Salmon, Gail Mackey y H. Hugh Fudenberg (The Journal of Immunology, Vol. 103, nº 1 páginas 129-137, julio de 1969, recibido para su publicación el 25 de noviembre de 1968). Ambas técnicas pueden  
5 detectar sólo antígenos o anticuerpos, no ambos, y difieren en otros detalles respecto a la técnica aquí descrita.

#### Resumen de la invención

Esta invención describe un método para detectar la presencia de proteínas capaces de actuar como antígenos o anticuerpos. El método comprende la puesta en contacto de  
10 cada muestra desconocida con dos superficies de antígeno en fase sólida, es decir, un antígeno fijado a una fase sólida. Esta última puede ser un tubo de ensayo o receptáculo similar o bien puede ser un vehículo de partículas sólidas,  
15 tal como cuentas de vidrio poroso. A los efectos de descripción de esta invención, la palabra "receptáculo" se empleará en el sentido de cualquier vehículo adecuado de antígenos en fase sólida.

Después de añadirse la muestra al antígeno en fase sólida, se agrega una cantidad de anticuerpo marcado a uno de  
20 los receptáculos (en adelante denominado receptáculo "indicador"). Al cabo de un período de tiempo determinado, se retira el contenido del otro receptáculo (en adelante denominado receptáculo "discriminador"), se lava tal receptáculo y  
25 se añade una cantidad de anticuerpo marcado igual a la agregada al receptáculo indicador. Luego se dejan en reposo ambos receptáculos durante un período de tiempo predeterminado. Seguidamente se retira el contenido no unido o no fijado de cada receptáculo y se mide la cantidad de radiación emitida por cada uno de ellos. Comparando tales cantidades de radiación emitida por cada receptáculo con con-  
30

5 troles negativos o curvas patrones (realizados con el uso de cantidades conocidas de antígeno o anticuerpo) o comparando las cantidades de radiación emitida de ambos receptáculos entre sí, es posible determinar entonces si la muestra contiene antígeno o anticuerpo.

Descripción de la invención

10 Esta invención se relaciona con un método de detección de sustancias capaces de actuar como antígenos y anticuerpos. Antes de esta invención, ha sido posible detectar sólo antígenos o anticuerpos, y no ambos, con el uso de una sólo técnica de radioinmunoensayo.

15 El método de esta invención comprende una serie de operaciones. La primera de ellas consiste en revestir con antígeno conocido un par de receptáculos idénticos, tales como tubos de ensayo o dos cantidades iguales de partículas sólidas, tales como cuentas de vidrio.

20 Los receptáculos pueden estar contruidos de un material insoluble en agua, tal como poliestireno, polietileno, polipropileno, nitrocelulosa, acrilamida o copolímeros de acrilonitrilo con estireno. También pueden usarse pequeñas partículas hechas de estos materiales, para servir de soporte al antígeno. Se seleccionan estos materiales porque la mayoría de las proteínas, y particularmente los antígenos asociados a la hepatitis, se unen o 25 fijan a ellos.

30 En la preparación de los receptáculos a utilizar en la invención aquí descrita, se fija el antígeno deseado a la superficie de aquellos mediante simple contacto de cada uno de ellos con cantidades similares de una solución de antígeno conocido. El pH de esta solución an-

tígena se mantiene entre 5 y 9 añadiendo adecuados neutralizadores. De esta manera, una porción del antígeno quedará fijada a la superficie de los receptáculos: a esto es a lo que se hace referencia al decir "antígeno en fase sólida". Después de dejar que el antígeno conocido permanezca en contacto con los receptáculos durante un período de tiempo predeterminado, se retira el contenido no fijado de cada uno de aquellos y se lavan estos últimos. Esto deja sólo antígeno conocido fijado a los receptáculos. Como variante, el antígeno puede fijarse a una fase sólida mediante adecuadas reacciones químicas, tal como ocurre con la celulosa activada con bromuro de cianógeno.

En este punto del proceso, pueden equilibrarse los receptáculos mediante su contacto durante un período de tiempo predeterminado con una albumina de suero bovino o cualquier otra proteína que no sea de la misma especie que el antígeno o anticuerpo objeto de ensayo. La operación de equilibrado sirve para rellenar con los receptores las superficies de los receptáculos que no han sido ocupados por el antígeno conocido, minimizándose así la absorción de proteína no específica durante la subsiguientes operaciones de proceso. Tras el equilibrado, se separa la solución equilibrada de las superficies de aquellos mediante el lavado y agitación en seco. Los receptáculos revestidos son estables durante varios meses cuando se conservan a 5° C.

Para realizar el ensayo objeto de esta solicitud, se añaden a los receptáculos cantidades de una muestra a ensayar respecto a la cual se desconoce la presencia de antígenos o anticuerpos. En el uso del método de esta inven-

ción para tamizar sangre humana en relación con antígenos o anticuerpos asociados a la hepatitis, la presencia de antígeno indica que el donador de sangre es portador de hepatitis, mientras que la presencia de anticuerpo indica que aquél ha tenido hepatitis en alguna ocasión.

Después de añadir las muestras, se agrega anticuerpo marcado, solamente al receptáculo indicador. Un anticuerpo marcado es una proteína, capaz de combinarse con un antígeno conocido y que lleva fijado cierto material radioactivo, por ejemplo un isotopo radioactivo del yodo, tal como el  $I^{125}$ . Como variante, podría fijarse una enzima, tal como fosfatasa alcalina de peroxidasa de rábano picante, al anticuerpo para servir de marcador o etiqueta. En un artículo titulado "The Preparation of  $I^{131}$  Labeled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity" ("Preparación de Hormona para Desarrollo Humano Marcada  $I^{131}$  de Elevada Radiactividad Específica"), de F.G. Greenwood, W.M. Hunter y J.S. Glover (Biochem. J., Vol. 89, 1963, páginas 114-123), se expone una técnica adecuada para la preparación de anticuerpo marcado.

Después de incubar ambos tubos a temperatura ambiente durante una hora por lo menos, se retira por completo mediante lavado el contenido del tubo discriminador y se añade anticuerpo marcado. Tras un período de tiempo predeterminado, generalmente una hora por lo menos, se desechan los contenidos de ambos tubos, se lavan éstos y se determina la radioactividad que queda en los mismos mediante conteo gamma.

Después de anotarse la radioactividad de cada receptáculo, se comparan los conteos con controles negativos

conocidos. Si el conteo de ambos receptáculos es máximo, determinado mediante utilización de conocidas muestras negativas o normales, puede llegarse a la conclusión de que la muestra objeto de ensayo no contiene ni antígeno ni anticuerpo. Si el conteo del receptáculo indicador es notablemente inferior al conteo de control negativo máximo y el del receptáculo discriminador es elevado o próximo al del control negativo, la muestra contiene antígeno. Si el conteo de ambos receptáculos es bajo en comparación con el control negativo, la muestra contiene anticuerpo.

Las razones de estas conclusiones son las siguientes. Si la muestra no contiene antígeno ni anticuerpo, el conteo de ambos receptáculos es elevado. El conteo del receptáculo indicador es elevado porque el anticuerpo marcado puede combinarse libremente con antígeno en fase sólida y por consiguiente no se une a ningún antígeno de la muestra. El conteo del receptáculo discriminador es elevado porque el anticuerpo marcado se une libremente al antígeno en fase sólida, porque ningún anticuerpo de la muestra se ha combinado con el antígeno en fase sólida antes de la adicción del anticuerpo marcado.

Si la muestra contiene antígeno, el conteo del receptáculo indicador será bajo porque el antígeno de la muestra líquida compete con el antígeno en fase sólida para la limitada cantidad de anticuerpo marcado que se ha añadido, reduciendo así la cantidad de isótopo que finalmente se une a la fase sólida. Así, sólo reacciona con el antígeno en fase sólida, y quedan unidas al mismo, pequeñas cantidades de anticuerpo marcado. Por otra parte, el con-

teo del receptáculo discriminador es elevado porque el antígeno de la muestra no se fija al antígeno en fase sólida y es retirado por lavado antes de la adición del anticuerpo marcado. Así, el anticuerpo marcado que se aña  
5 de al receptáculo discriminador se une libremente al antígeno en fase sólida y hace que el receptáculo discriminador presente un conteo de radiactividad igual al del control negativo.

Si la muestra contiene anticuerpo, ambos receptácu-  
10 los presentarán un bajo conteo. Esto se debe a que en am bos receptáculos el anticuerpo de la muestra se fija al antígeno en fase sólida y limita sustancialmente la cantidad de antígeno en fase sólida disponible para su combinación con anticuerpo marcado.

15 El método de esta invención es particularmente útil para detectar la presencia de antígenos y anticuerpos asociados a la hepatitis. Contrariamente a todos los ensayos conocidos sobre antígenos-anticuerpos que detectan a unos u otros, pero no a ambos, el método de esta invenci  
20 ción proporciona la posibilidad de detectar antígenos o anticuerpos asociados a la hepatitis empleando un sólo procedimiento de ensayo.

Como la detección de antígenos y anticuerpos asociados a la hepatitis es el uso preferido del método de  
25 la invención, se describirá ahora específicamente un pro cedimiento en el que la proteína que se pretende identificar es un antígeno o un anticuerpo asociados a la hepatitis. Sin embargo, debe entenderse que el método de esta invención puede emplearse en cualquier sistema an-  
30 tígeno-anticuerpo.

En un ejemplo práctico de utilización del método de la invención, se emplearon como receptáculos tubos de ensayo de poliestireno de 10 x 75 mm. Tales tubos se revis-  
5 tieron con 0,2 ml de una solución de antígeno purificada y asociada a la hepatitis. La solución tenía un pH de 7,4 y comprendía aproximadamente  $10^{14}$  partículas de antígeno asociado a dicha afección por ml en neutralizador de ácido etileno diamino acético 0,2 M que contenía  $Cl_2 Mg$  0,001M. Se dejaron los tubos a temperatura ambiente durante toda  
10 la noche.

A la mañana siguiente se retiró la solución de antígeno de los tubos. Luego se equilibraron con 1 ml de solución de albúmina bovina al 0,5% durante cuatro horas. Seguidamente se enjuagaron con salina neutralizada con fos-  
15 fato (pH 7,2). En esta fase del proceso los tubos podían guardarse a unos 5°C durante varios meses sin pérdida de actividad.

Luego se marcó el anticuerpo asociado a la hepatitis usando  $I^{125}$  de acuerdo con las técnicas descritas en el  
20 artículo de Greenwood y colaboradores antes identificado. El anticuerpo podía marcarse también con cualquier sustancia fácilmente detectable, tal como grupos nitrofenilos que pueden cuantificarse mediante técnicas de resonancia por rotación electrónica, o con enzimas tales como fos-  
25 fatasa alcalina peroxidasa de rábano picante.

Para analizar muestras de plasma o suero, se siguió entonces el siguiente procedimiento. Se añadieron 0,1 ml de una muestra a ensayar a cada uno de un par de tubos de ensayo o receptáculos preparados como se ha descrito ante-  
30 riormente. Después de una hora a temperatura ambiente, se

añadieron 0,1 ml de la solución de anticuerpo marcado a un tubo, en adelante denominado tubo "indicador". Al mismo tiempo, se retiró el contenido del otro tubo, en adelante denominado tubo "discriminador".

5 Se lavó varias veces el tubo discriminador con salina neutralizada con fosfato (pH 7,2) y se agregaron 0,1 ml de anticuerpo marcado y 0,1 ml de dicha salina. Los 0,1 ml de esta salina afectaron a la reacción antígeno-anticuerpo solamente en la medida en que hicieron que el volumen del  
10 receptáculo discriminador sea igual al del receptáculo indicador. Esto asegura el que la reacción en el tubo discriminador no varíe en relación con el tubo indicador debido a diferencias de volumen.

15 Después de dos horas se retiró el contenido de ambos tubos y se lavaron éstos. Luego se colocaron los tubos en un contador gamma de pozo profundo y se midió su radiactividad. Comparando los datos CFM de cada tubo, es posible determinar si se halla presente antígeno o anticuerpo, o ninguno de ellos, en una muestra.

20 En la Tabla I se muestran los resultados obtenidos usando la citada técnica con un control negativo, suero normal, es decir, suero conocidamente libre de antígeno o anticuerpo asociados a la hepatitis, y muestras de un panel del National Institute of Health (NIH) conocidamente  
25 dotadas de tales antígenos y anticuerpos.

Tabla I

<u>Muestra</u>	<u>CPM</u>		<u>% del normal</u>		<u>Interpretación.</u>
	<u>Indicador</u>	<u>Discriminador</u>	<u>Indicador</u>	<u>Discriminador</u>	
Normal	2519	3882			
30 Normal	2345	3200	100	100	Normal

Tabla I (continuación)

<u>Muestra</u>	<u>CPM</u>		<u>% del normal</u>		<u>Interpre- tación.</u>
	<u>Indi- cador</u>	<u>Descri- minador</u>	<u>Indi- cador</u>	<u>Descri- minador.</u>	
Panel NIH Nº					
234	747	3630	30,8	102,4	Antígeno
5 243	1846	3677	76,0	103,7	Antígeno
231	118	832	4,9	23,5	Anticuerpo
248	15	2612	0,6	73,7	Anticuerpo

Los números 234 y 243 del panel del NIH son muestras de suero que conocidamente contienen antígeno asociado a la hepatitis. Tal como se expone anteriormente, una lectura CPM del tubo indicador inferior al control negativo o normal en combinación con una lectura CPM del tubo discriminador que sea elevada o próxima a la lectura del control negativo indica la presencia de antígeno en la muestra ensayada. Las lecturas CPM para los números 234 y 243 del panel del NIH encajan con este patrón y por consiguiente ilustran la capacidad del método de esta invención para detectar antígenos.

La capacidad del método de la invención para detectar anticuerpos se ilustra mediante los resultados obtenidos al ensayarse los números 231 y 248 del citado panel. Tal como anteriormente se explica, unas bajas lecturas CPM en los receptáculos indicador y discriminador, en comparación con las lecturas CPM del control negativo, indican la presencia de anticuerpo. Las lecturas <sup>CPM</sup>/obtenidas ensayando los números 231 y 248 del mencionado panel confirmaron la existencia en las muestras de anticuerpo asociado a la hepatitis.

Las elevadas lecturas CPM en ambas muestras normales confirmaron la ausencia de antígeno y anticuerpo de dichas muestras.

5 Se pretende incluir modificaciones y variaciones comprendidas en el ámbito de las siguientes reivindicaciones.

NOTA DE REIVINDICACIONES

10 Se reivindica como de propia y nueva invención, a favor de Baxter Laboratories, Inc., con domicilio en Morton Grove/ Illinois (Estados Unidos), lo especificado en las siguientes reivindicaciones:

1.- Método para detectar en muestras de plasma o suero sanguíneo la presencia de proteínas capaces de actuar como antígenos o anticuerpos, caracterizado en que comprende las siguientes operaciones:

15 (a) el revestimiento de una porción por lo menos de la superficie de un par de receptáculos con un antígeno conocido;

(b) la adición de muestras a dicho par de receptáculos;

20 (c) la adición de anticuerpo marcado a uno de los receptáculos del citado par;

(d) dejar que dicho par de receptáculos permanezcan en reposo durante un período de tiempo predeterminado;

25 (e) la retirada del contenido del otro de los dos receptáculos y la ulterior adición a este receptáculo de una cantidad de anticuerpo marcado igual a la añadida al pri-

mer receptáculo en la operación (c);

(f) dejar que dicho par de receptáculos permanezcan en reposo durante un período de tiempo predeterminado;

5

(g) retirar/cada uno de los dos receptáculos el contenido no unido;

(h) medir la cantidad de radiación emitida de cada receptáculo;

10

(i) comparar las cantidades de radiación emitidas de los dos receptáculos con las cantidades de radiación emitidas de controles negativos para determinar si la muestra contiene antígeno o anticuerpo o ninguno de ellos.

2.- Método según la reivindicación 1, caracterizado en que dichos receptáculos están contruidos de material insoluble en agua.

15

3.- Método según la reivindicación 1, caracterizado en que en la operación (a) el citado antígeno es un asociado a la hepatitis y en la operación (c) el referido anticuerpo lo es respecto al antígeno asociado a la hepatitis.

20

4.- Método según la reivindicación 1, caracterizado en que en la operación (c) el mencionado anticuerpo marcado lo está con un isótopo radiactivo de yodo.

5.- Método según la reivindicación 4, caracterizado en que dicho isótopo radiactivo del yodo es el I<sup>125</sup>.

25

6.- Método según la reivindicación 1, caracterizado en que en las operaciones (d) y (f) el citado período predeterminado de tiempo es suficiente para permitir una máxima unión de los materiales en los citados receptáculos, entre sí o a éstos últimos.

7.- Método según la reivindicación 2, caracterizado

en que el citado material insoluble en agua es un polímero seleccionado entre el grupo consistente en poliestireno, polietileno, polipropileno, nitrocelulosa y copolímeros de acrilonitrilo con estireno.

5           8.- Método según la reivindicación 2, caracterizado en que dicho material insoluble en agua está constituido por cuentas de vidrio.

          9.- "METODO PARA DETECTAR EN MUESTRAS DE PLASMA O SUE  
RO SANGUINEO LA PRESENCIA DE PROTEINAS CAPACES DE ACTUAR  
10        COMO ANTIGENOS O ANTICUERPOS"

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

Madrid, 26 de Octubre de 1974

P.A. de Baxter Laboratories, INC.

Victor Gil Vega:

