

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

10	ES	11	NUMERO	10	A1
		21	451061		
		22	FECHA DE PRESENTACION		
			27-8-76		

PATENTE DE INVENCION

P. - 63.862
2 37267
CASE 5647 DI
Div.

60 PRIORIDADES:		
61 NUMERO	62 FECHA	63 PAIS
550.949 (parcial)	19-2-75	EE.UU.
64 FECHA DE PUBLICIDAD	65 CLASIFICACION INTERNACIONAL	66 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G01N	Nº 445.042
67 TITULO DE LA INVENCION		
"UN METODO MEJORADO PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DEL ANTIGENO DE SUPERFICIE DE HEPATITIS B EN LA SANGRE HUMANA"		
71 SOLICITANTE (S)		
PFIZER INC.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
235 42nd Street, Nueva York, Nueva York, EE.UU.		
72 INVENTOR (ES)		
GEORGE EDWARD LOWKE y BELA ZOLTAN HORVATH.		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ		

Esta invención está relacionada con una composición de diagnóstico para la detección del antígeno de superficie de hepatitis B en la sangre humana que consiste de una suspensión acuosa de partículas de resina sintéticas finamente divididos de tamaño casi uniforme revestidas con un anticuerpo purificado específico al antígeno de superficie de hepatitis B. El anticuerpo empleado es un anticuerpo altamente purificado específico para el antígeno de superficie de hepatitis B que se prepara de un antígeno de superficie de hepatitis B altamente purificado obtenido de la sangre humana. Esto da por resultado una mayor especificidad y mayor sensibilidad. Se reducen al mínimo los positivos falsos mediante la adición de suero normal de la misma especie de animal que aquel de donde se obtuvo el suero que contiene el anticuerpo, y la confirmación de todos los sueros positivos utilizando un anticuerpo asociado con la hepatitis humana un control de suero humano normal y un reactivo de absorción del factor reumatoide. Todos los positivos se vuelven a probar en una prueba de confirmación para determinar de nuevo los "positivos falsos". Esto se efectúa (a) neutralizando todas las muestras de sangre de prueba positivas mezclándose con el anticuerpo asociado con la hepatitis humana, (b) absorbiendo el factor reumatoide en las muestras de prueba del paso (a) que contiene el factor, mezclándose con cuentas de látex y revestidas con gamma-globulina humana y (c) mezclando de nuevo las muestras de prueba positivas con la composición de diagnóstico de esta

invención.

La composición de diagnóstico de la presente invención está diseñada para ser altamente sensible y específica para la detección del antígeno de superficie de hepatitis B en la sangre humana: (a) empleando partículas de resina revestidas con un anticuerpo purificado que se prepara de animales inmunizados con el antígeno de superficie de hepatitis B purificado y (b) reduciendo al mínimo los "positivos falsos" mediante la adición de suero normal de la misma especie de animal que aquel desde donde se obtuvo el suero que contiene el anticuerpo y (c) confirmar todos los sueros positivos utilizando un anticuerpo asociado con la hepatitis humana para la neutralización del antígeno, un control de suero humano normal y un reactivo de absorción del factor reumatoide.

La composición de diagnóstico de la presente invención consiste de una suspensión acuosa de partículas de resina sintética finamente divididos revestidas con un anticuerpo altamente purificado específico para el antígeno de superficie de hepatitis B. De preferencia las partículas son partículas de poliestireno esféricas que tienen un diámetro de aproximadamente 0.23 micrones, pero son también apropiadas partículas de poliestireno u otras resinas sintéticas v. gr., resinas acrílicas que tengan dimensiones uniformes de 0.05 a 2.0 micrones.

El anticuerpo específico para el antígeno de superficie de hepatitis B, de preferencia se deriva del suero obtenido de

mamíferos, v. gr., seres humanos, corderos, cabras, conejos o conejillos de india o de fuentes de aves tales como pollos o pavos que contienen el anticuerpo o que se han inmunizado con el antígeno de superficie de hepatitis B altamente purificado obtenido de la sangre humana.

Los conejillos de india u otras especies de animales tales como conejos, cabras, etc., se inmunizan con el antígeno de superficie de hepatitis B purificado mediante el método que se describe en la Patente Norteamericana Número 3,838,144. Una inmunización primaria con el antígeno en un adyuvante completo de Freund en las patas es seguido por inoculaciones de antígeno repetidas intraperitoneales, intramusculares, subcutáneas o intravenosas con o sin el adyuvante. Después de formar un charco de los sueros recogidos de los animales inmunizados, el anticuerpo residual para las proteínas del suero humano, si está presente, se remueve poniendo en contacto el antisuero con suero humano normal. La gamma-globulina puede luego aislarse mediante precipitación con sulfato desodio acuoso al 14 por ciento, dializarse contra una salina estabilizada con fosfato, acuosa, y de preferencia se calienta a temperatura de 56°C. durante más o menos 30 minutos para destruir el complemento.

El anticuerpo se purifica adicionalmente mediante los métodos generales que se describen en *The Journal of Immunology*, Vol. 106, Número 3, páginas 589 a 597, de marzo de 1971, y *Biochemistry*, Volumen 6, Número 5, páginas 1460 a 1466 de mayo

de 1967. El anticuerpo de superficie de hepatitis B específico se purifica de los sueros de animales absorbidos (de preferencia sueros de conejillo de indias) mezclando los sueros, en proporciones óptimas, con los sueros humanos que contienen el antígeno de superficie de hepatitis B incubándose a temperatura de 37°C. durante una hora, y luego durante la noche a temperatura de 4°C. El material precipitado de antígeno-anticuerpo formado de esta manera, se lava luego dos veces con una salina estabilizada con fosfato fría para remover la mayoría de las proteínas residuales no especificadas. El material precipitado de antígeno-anticuerpo se disuelve luego en ácido acético de 0.2M frío/2 por ciento de sucrosa, de un pH de 2.3 o varias molaridades de iones caotrópicos (v. gr., tiocianato de sodio de 2.0M, de pH de 6.6). Aquellas personas expertas en el ramo reconocerán que pueden emplearse otros estabilizadores apropiados para disociar los complejos de antígeno-anticuerpo. Estos antígenos de anticuerpos disociados se separan mediante centrifugación a de 25,000 a 28.000 revoluciones por minuto durante de 12 a 15 horas o a 30,000 revoluciones por minuto durante 4 horas en un gradiente de sucrosa de 10 a 40 por ciento continuo en un rotor de zona Beckman T1-15. El rotor se descarga bombeando 50 por ciento de sucrosa para desplazar el gradiente y se ensayan fracciones de 20 mililitros para determinar la absorción de luz ultravioleta en una célula de un centímetro a 280 m μ y las fracciones máximas se forman en un charco para proporcionar una frac-

ción de anticuerpo específica purificada y una fracción de antígeno purificada. Ambas fracciones luego se neutralizan con NaOH de concentración de 0.1N. La fracción del anticuerpo se concentra al volumen del suero original y se dializa durante la noche contra salina estabilizada con glicina. El anticuerpo purificado luego se evalúa y se normaliza.

La azida de sodio, 0.1 por ciento, puede luego añadirse como un agente de conservación para usarse en la preparación del reactivo de diagnóstico. El anticuerpo opcionalmente se diluye preparando lotes pequeños del reactivo de diagnóstico con varias diluciones del anticuerpo y probando estos contra un tablero de sueros humanos que se sabe que contienen el antígeno de superficie de hepatitis B. La dilución que proporciona el mejor funcionamiento contra el tablero cuando se revisten las partículas de resina se selecciona para la preparación del reactivo de diagnóstico.

El anticuerpo apropiadamente diluido se mezcla con cuentas de látex de poliestireno de un diámetro de 0.2 micrones. Después de mezclarse de una a dos horas, las cuentas se lavan tres veces con una salina estabilizada con glicina y se resuspenden en una salina estabilizada con glicina.

La suspensión acuosa de preferencia contiene más o menos 0.5 por ciento en peso/volumen de las partículas de resina, pero podría contener de 0.1 a 3 por ciento en peso/volumen de las partículas de resina. Para la preparación del reactivo

de diagnóstico, la suspensión de preferencia contiene más o menos 0.05 por ciento en peso/volumen del anticuerpo absorbido en las partículas de resina, pero esta cantidad puede variarse de acuerdo con la concentración de las partículas. La proporción del anticuerpo debe ser justamente suficiente para impedir la autoagregación de las partículas de resina. Para partículas de poliestireno esféricas de 0.23 micrones de diámetro, esto es aproximadamente una décima parte del peso de las partículas.

La suspensión de preferencia contiene un estabilizador que se añade después de la absorción del anticuerpo en las partículas, v. gr., una proteína inerte tal como albúmina de suero a una concentración por ejemplo de 0.1 por ciento en peso/volumen.

De conformidad con una modalidad preferida de la invención, el reactivo del diagnóstico contiene también suero normal (es decir, suero que no contiene el anticuerpo específico para el antígeno de superficie de hepatitis B ni el antígeno mismo) obtenido de la misma especie animal que aquel del cual se obtuvo del suero que contiene el anticuerpo. La presencia de este suero normal reduce considerablemente la proporción de "positivos falsos" cuando se usa el reactivo de diagnóstico para detectar el antígeno de superficie de hepatitis B en las muestras de sangre. De preferencia, más o menos 1 parte de suero normal se incluye por de 20 a 50 partes (en volumen) de la suspensión acuosa de las partículas de resina revestidas con el anticuerpo.

Si el suero normal de la misma especie de animal que aquel del cual se obtuvo el suero que contiene el anticuerpo no se incluye en el reactivo de diagnóstico, aproximadamente el 10 por ciento de sueros humanos que no contienen antígeno de superficie de hepatitis B se aglutinarán las partículas de resina. Esto es probablemente debido a la presencia de sustancias en los sueros humanos que reaccionan con otros materiales que se originan del antisuero animal del cual se obtuvo el anticuerpo para el antígeno de superficie de hepatitis B. Si se incluye el suero de animal normal, sin embargo, sólo entre 1 por ciento y 3 por ciento de los sueros humanos aglutinarán las partículas de resina en ausencia del suero desde el antígeno de superficie de hepatitis B. Esto puede ser debido a que los componentes en el suero animal normal son capaces de reaccionar con aquellas sustancias en los sueros humanos e impedir que los mismos ocasionen aglutinación de las partículas de resina.

Se proporciona un control de suero humano normal que se produce de suero humano normal no diluido que se muestra como siendo negativo para el antígeno de superficie de la hepatitis B mediante el reactivo de látex y mediante radioinmunoensayo.

Se prepara un suero de control positivo de un charco del suero humano positivo del antígeno de superficie de hepatitis B conocidos. El suero se trata térmicamente a temperaturas de 60°C. durante por lo menos 10 horas para destruir la naturaleza infecciosa del virus y luego se diluye en serie dos veces en

suero humano. La dilución usada para el producto es aquella que proporciona una reacción 1+ definida con el reactivo del látex.

El sistema de reactivo de diagnóstico consiste de los siguientes componentes:

A. Sistema de Prueba de Clasificación

1. Anticuerpo Asociado con Hepatitis absorbido en cuentas de látex
2. Suero de Control Positivo
3. Suero de Control Negativo

B. Sistema de Prueba de Confirmación

1. Anticuerpo Asociado con Hepatitis (humano)
2. Control de Suero Humano Normal (negativo para el antígeno de superficie de hepatitis B)
3. Reactivo de Absorción del Factor Reumatoide
4. Diluyente de Prueba de Confirmación

El anticuerpo asociado con hepatitis (humano) se produce del plasma humano que contiene anticuerpos para el antígeno de superficie de hepatitis B. El plasma es recibido de varios centros de plasmaforésis, se evalúa mediante difusión de gel y se convierte en suero mediante la adición de cloruro de calcio y trombina de bovino. La gamma globulina se prepara luego del suero mediante precipitación con sulfato de sodio al 16 por ciento. Después de lavar el material precipitado en sulfato de sodio de 14 por ciento, se dializa durante la noche contra un agente estabili-

za durante la noche contra un agente estabilizador de fosfato de baja molaridad y se hace pasar a través de DEAE-celulosa que se ha equilibrado anteriormente con el mismo agente estabilizador. La gamma globulina purificada luego se normaliza mediante concentración y se dializa contra una salina estabilizada con fosfato.

El reactivo absorbente del factor reumatoide consiste de cuentas de látex revestidas con gamma globulina humana normal. Se produce elaborando una solución normal de gamma globulina purificada en una salina estabilizada con glicina, añadiendo una suspensión de cuentas de poliestireno de 0.2 micrones y calentándose a temperatura de 57°C. durante 15 minutos. La suspensión luego se diluye en salina estabilizada con glicina.

El diluyente de prueba de confirmación se prepara diluyendo una solución de albumina de suero de bovino al 30 por ciento con salina estabilizada con fosfato hasta una concentración de proteína del 5 por ciento.

Métodos de Prueba

A. Preparación de la Muestra de Sangre

El suero es la forma preferida del espécimen de sangre. Si la muestra de prueba es de sangre entera, debe primero tratarse para lisar las células en la misma e impedir la coagulación. Para este objeto puede tratarse con un diluyente acuoso

que contiene un surfactante no iónico del tipo de alquifenol polioxietilado, v. gr. isoocetilfenoxi-polioxietil-etanol (Triton X-100, de Rohm and Haas Company) y citrato de sodio.

Si la muestra de prueba es de plasma sanguíneo, debe contener un anticoagulante v. gr. cualesquiera de los anticoagulantes normales tales como citrato de sodio. Se trata también ventajosamente con el mismo diluyente acuoso que contiene un surfactante no iónico tal como para la sangre entera a fin de lisar cualquiera de las células residuales presentes en el mismo.

B. Reactivos

1. Reactivo de Látex

a. Especificidad

1. Determinada probando el reactivo con el tablero de sueros positivos y negativos suministrado por el Departamento de Biología así como un tablero de 100 sueros negativos recogidos de voluntarios normales.

b. Reactividad

1. Se resuspende el reactivo mediante agitación vigorosa.

2. A uno de los pozos de prueba en las placas de prueba de plástico se distribuyen 3 gotas del suero de control positivo. Al segundo pozo adyacente se distribuyen 3 gotas del suero de control negativo.

3. A cada muestra se surte una gota de reactivo.

4. Se mezcla completamente usando un mezclador separado para cada pozo.
5. Se hace girar la placa en el dispositivo giratorio mecánico durante 10 minutos a 150 revoluciones por minuto.
6. Se examinan las mezclas sobre una caja visual de iluminación indirecta.
7. Debe observarse una reacción débil (1+) claramente positiva con la muestra de suero de control positivo. No debe observarse reacción con la muestra de suero de control negativo.

2. Suero de Control Positivo

a. Reactividad

1. El suero de control positivo se prueba con el reactivo de látex para asegurar una reactividad de 1+.

3. Suero de Control Negativo

a. Reactividad

1. El suero de control negativo se prueba con el reactivo de látex para asegurarse de una reacción negativa.

4. Control de Suero Humano Normal

a. Especificidad

1. Se lleva a cabo la prueba de confirmación para asegurarse que no reaccione con el reactivo de látex

y que no inhiba los sueros positivos del antígeno de superficie de hepatitis B.

5. Anticuerpo Asociado con Hepatitis (humano)

a. Reactividad

1. Se lleva a cabo una evaluación de difusión de gel usando un antígeno de superficie de hepatitis B normal.

b. Especificidad

1. Se lleva a cabo una prueba de uso para determinar si el suero inhibirá específicamente las muestras positivas del antígeno de superficie de hepatitis B cuando se utilizan en el protocolo de la prueba de confirmación.

6. Reactivo de Absorción

a. Reactividad

1. El reactivo se prueba con sueros que contienen el factor Reumatoide para asegurarse de que reacciones con el factor y sea parcialmente absorbido en el mismo desde los sueros que contienen el mismo.

7. Diluyente de Prueba de Confirmación

a. Especificidad

1. Se lleva a cabo la prueba de confirmación utilizando el diluyente para asegurarse de que no reaccione

con el reactivo de látex que no inhiba los sueros positivos del antígeno de superficie de la hepatitis B.

C. Prueba de las Muestras de Suero (Prueba de Clasificación)

1. Se distribuyen 120 microlitros de suero hacia un pozo en la placa de plástico.
2. Se añade una gota de Reactivo de Látex.
3. Se mezclan completamente usando un mezclador desechable separado para cada muestra.
4. Se hace girar la placa en un dispositivo giratorio mecánico durante 10 minutos a 150 revoluciones por minuto.
5. Se examinan las mezclas a través de una caja visual de iluminación indirecta.
6. Se clasifican las reacciones en una escala de 1+ a 4+ que corresponden a la intensidad aumentada de aglutinación.

D. Procedimiento de Neutralización de Confirmación

1. Especímenes

- a. Todos los especímenes se identificaron como positivos en la prueba de clasificación.
- b. Suero de Control Positivo incluido como un espécimen positivo débil.

2. Procedimiento

- a. Rotúlese un tubo de prueba desechable de 10 por 75 milímetros con el número de identificación del espécimen y "A". Rotúlese un segundo tubo con el número de identificación del espécimen y "B".
- b. Añádase dos gotas (aproximadamente 80 microlitros) del anticuerpo Asociado a la Hepatitis (humano) al tubo rotulado "A".
- c. Añádase dos gotas del Suero de Control Negativo Humano Normal al tubo rotulado "B".
- d. Añádase 240 microlitros del espécimen de prueba a cada uno de los tubos rotulados "A" y "B".
- e. Mézclese el contenido de los tubos e incúbase durante 30 minutos a temperatura de 37°C. en un baño de agua.
- f. Pruébense 120 microlitros de los tubos "A" y "B" usando los reactivos y procedimiento de clasificación. Para las muestras positivas evaluadas relativamente bajas, puede efectuarse una diferenciación entre los positivos específico y no específico sin pruebas adicionales ya que la muestra "A" no reaccionará mientras que la muestra "B" permanece positiva, indicando una inhibición específica mediante el anticuerpo humano. Para aquellas muestras que son específicas pero que tienen mayor evaluación así como aquellas que no son específicas, se requiere una prueba adicional tal y como se menciona detalladamente a continuación.

g. Para cada tubo que requiere prueba adicional, rotúlense 6 tubos adicionales con diluciones de 1:4 a 1:128 y con la identificación del espécimen así como con "A" o "B".

b. Añádanse 200 microlitros del diluyente de prueba de confirmación a cada tubo incluyendo los tubos que contienen el espécimen del paciente y el Antisuero Humano o el Suero Humano Normal, es decir los tubos originales "A" y "B" proporcionen en los mismos aproximadamente una dilución de 1:2.

i. Efectuése diluciones dobles transfiriendo 200 microlitros usando boquillas separadas de microprobeta para cada tubo y mezclándose bien antes de sacar las muestras.

j. Pruébense 120 microlitros de cada tubo usando los reactivos y procedimientos de plastificación.

k. La evaluación obtenida en la hilera "B" (especimen y Suero Humano Normal) cuadruplicarse (dos tubos) más que en la hilera "A" (especimen y anticuerpo asociado con la hepatitis (humano) de neutralización a fin de considerar el espécimen como un positivo del antígeno de superficie de hepatitis B específico). En casos en donde la evaluación tanto de "A" como de "B" es mayor de 1:128, la dilución debe llevarse a cabo y finalmente hasta que se determine el punto final.

Puesto que un número de especímenes que contienen el Factor

Reumatoide reaccionarán con el reactivo de látex, es necesario diferenciar aquellos especímenes que contienen tanto el antígeno de superficie de hepatitis B como el Factor Reumatoide.

La presencia del Factor Reumatoide puede determinarse probando el suero con el reactivo de absorción del Factor Reumatoide (látex producido como gamma globulina humana) mezclando 120 microlitros del espécimen y una gota del reactivo de absorción en una platina de plástico y haciéndose girar durante 5 minutos.

Si los especímenes contienen el Factor Reumatoide, puede absorberse añadiéndose 720 microlitros de los especímenes a un tubo de prueba de 10 por 75 milímetros incluyendo 6 gotas del reactivo de absorción en el tubo. Mézclase bien e incúbase a temperatura ambiente durante 15 minutos. Centrifúguese a 3,000 revoluciones por minutos durante 5 minutos. Llévase a cabo el procedimiento de neutralización de confirmación en el espécimen absorbido tal y como se ha presentado detalladamente en lo que antecede.

Preparación del Anticuerpo Purificado para el Antígeno de Superficie de Hepatitis B

Se inmunizan conejillos de Indias con el antígeno de superficie de hepatitis B purificado mediante el método que se describe en la Patente Norteamericana Número 3,838,144.

Una inmunización primaria con el antígeno en un adyuvante completo de Freund en las patas de los conejillos de indias fue seguido por dos inoculaciones intraperitoneales del antígeno sin adyuvante. Después de formar un charco de los sueros recogidos de los animales inmunizados, el anticuerpo residual a las proteínas de suero humano se remueve si es necesario poniendo en contacto el antisuero con suero humano normal. La gamma globulina luego se purifica mediante precipitación con sulfato de sodio acuoso al 14 por ciento en peso/volumen, se dializa contra salina estabilizada con fosfato acuoso y de preferencia se calienta a temperatura de 56°C. durante aproximadamente 30 minutos para destruir el complemento.

El suero purificado se mezcla con suero humano que contiene el antígeno de superficie de hepatitis B incubado a 37°C. durante una hora y luego durante la noche a temperatura de 4°C. El material precipitado del antígeno-anticuerpo formado de esta manera se lava luego dos veces en salina estabilizada con fosfato fría para remover la mayoría de las proteínas no específicas residuales. El material precipitado de antígeno-anticuerpo se disuelve luego en ácido acético frío de 0.2M/2 por ciento de sucrosa, con un pH de 2.3 o iones caotrópicos. Los antígenos y anticuerpos disociados se separan mediante centrifugación a 25,000 a 28,000 revoluciones por minuto durante de 12 a 15 horas o a 30,000 revoluciones por minuto durante 4 horas en un gradiente de sucrosa del 10

al 40 por ciento continuo en un rotor de zona Beckman TI-15. El rotor se descarga bombeando 50 por ciento de la sucrosa para desplazar el gradiente y se someten a ensayo fracciones de 20 mililitros para determinar la absorción de luz ultravioleta en una célula de 1 centímetro a 280 milimicrones, y las fracciones máximas se forman en un charco para proporcionar una fracción de anticuerpo específica purificada que luego se neutraliza con NaOH de concentración 0.1N. La fracción del anticuerpo se concentra al volumen del suero original y se dializa durante la noche contra salina estabilizada con glicina. El anticuerpo purificado luego se evalúa y se normaliza.

El anticuerpo se diluye de manera óptima preparando lotes pequeños del reactivo de diagnóstico con varias diluciones del anticuerpo y probándose estos contra un tablero de sueros humanos que se sabe que contiene el antígeno de superficie de hepatitis B. La dilución que proporciona el mejor funcionamiento contra el tablero cuando se revisten las partículas de resina se selecciona para la preparación del reactivo de diagnóstico.

Preparación de Reactivo de Diagnóstico

EJEMPLO I

Una suspensión acuosa al 30 por ciento en peso/volumen de 0.23 micrones de esferas de poliestireno fabricadas

por Dow Chemical se diluye al 8 por ciento en peso/volumen con salina estabilizada con glicina y se dializa contra la salina estabilizada con glicina durante la noche. Luego se añade inmediatamente a 9 volúmenes de antisuero purificado de conejillo de indias que contiene el anticuerpo para el antígeno de superficie de hepatitis B (diluido hasta 0.05 por ciento en peso/volumen) y se agita constantemente durante 30 minutos. Un volumen de la albúmina de suero de bovino (1 por ciento en peso/volumen) se añade luego y finalmente se añade la azida de sodio para proporcionar una concentración de 0.1 por ciento en peso/volumen en el producto final.

EJEMPLO II

Una suspensión al 30 por ciento en peso/volumen de esferas de poliestireno (0.05 a 2.0 micrones) se diluye hasta el 8 por ciento con salina estabilizada con glicina y se esteriliza mediante la adición de una solución de hipoclorito. Luego se dializa contra salina estabilizada con glicina para remover el hipoclorito. Se añade luego a 9 volúmenes de anticuerpos de suero purificado apropiadamente diluido de conejillo de indias para el antígeno de superficie de hepatitis B. La suspensión de poliestireno se añade lentamente con agitación la cual se continúa durante una hora. Las esferas de poliestireno se centrifugan, se lavan dos veces en la centrifuga con salina estabilizada y se vuelven a suspender hasta

el volumen original en la salina estabilizada. Se añade albúmina de suero de bovino con agitación durante 30 minutos. Una décima parte de un volumen del suero normal diluido de los conejillos de indias no inmunizados (diluido hasta 1:3.5 con salina estabilizada con glicina) se añade y la mezcla de nuevo se agita durante 30 minutos. Finalmente la mezcla se agita vigorosamente para dispersar cualquiera de las aglomeraciones de las partículas. Todas las soluciones utilizadas se esterilizan mediante filtración y contienen 0.1 por ciento en peso/volumen de azida de sodio como un agente de conservación.

EJEMPLO III

Se prepara un suero de control positivo de un charco de un suero humano positivo de antígeno de superficie de hepatitis B conocido. El suero se trata térmicamente a temperatura de 60°C. durante aproximadamente 10 horas para destruir la naturaleza infecciosa del virus y luego se diluye en serie dos veces en suero humano normal. La dilución usada es aquella que proporciona una reacción '1+' definida con el reactivo de látex del Ejemplo I o del Ejemplo II. Luego se filtra de manera estéril y se llena en recipientes esteriles.

EJEMPLO IV

Se produce un suero de control negativo de suero humano no diluido que se muestra que es negativo para el antígeno de superficie de hepatitis B mediante el reactivo de látex del Ejemplo I o del Ejemplo II y mediante radioinmunoensayo. Se filtra de manera estéril y se llena en recipientes esteriles.

EJEMPLO V

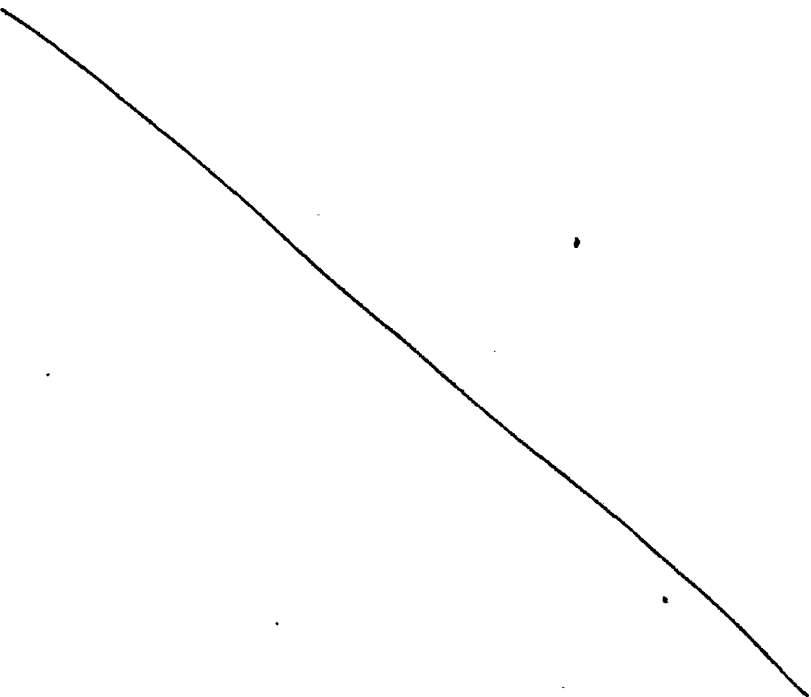
El plasma humano que contiene anticuerpos para el antígeno de superficie de hepatitis B se evalúa mediante difusión de gel y se convierte en suero mediante la adición de cloruro de calcio y trombina de bovino. La gamma globulina se prepara luego del suero mediante precipitación con sulfato de sodio al 16 por ciento en peso/volumen. Después de lavar el material precipitado en sulfato de sodio al 14 por ciento en peso/volumen, se dializa durante la noche contra un agente estabilizador de fosfato de baja molaridad y se hace pasar a través de DEAE-celulosa que se ha equilibrado anteriormente con el mismo agente estabilizador. La gamma globulina purificada luego se normaliza mediante concentración y se dializa contra la salina estabilizada con fosfato. Luego se filtra de manera estéril y se llena en recipiente esteriles.

EJEMPLO VI

Una solución normal de gamma globulina humana purificada en salina estabilizada con glicina se añade a una suspensión de látex de poliestireno de 0.2 micrones y se calienta a temperatura de 57°C. durante 15 minutos. La suspensión, que se usa para absorber el factor reumatoide en los sueros de prueba, se diluye en salina estabilizada con glicina y se llena en recipientes estériles.

EJEMPLO VII

Se prepara un diluyente de prueba de confirmación diluyendo una solución de albúmina de suero de bovino al 30 por ciento en peso/volumen con salina estabilizada con fosfato hasta una concentración de proteína del 5 por ciento en peso/volumen. La solución luego se filtra de manera estéril y se llena en recipientes esteriles.



- REIVINDICACIONES -

5 Los puntos de invención propia y nueva que se
presentan para que sean objeto de esta solicitud de Pa-
tente de Invención en España, por VEINTE años, son los
que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10 1ª.- Un método mejorado para determinar la
presencia del antígeno de superficie de hepatitis B
en la sangre humana, caracterizado por mezclar muestras
de prueba de dicha sangre exenta de glóbulos rojos con
una composición de diagnóstico que comprende una suspen-
sión acuosa de partículas de poliestireno esféricas sus-
15 tancialmente uniformes que tienen un diámetro de aproxi-
madamente 0,23 micrones revestidas con un anticuerpo es-
pecífico para dicho antígeno de superficie de hepatitis
B, derivándose dicho anticuerpo del suero de conejillos
de Indias que han sido inmunizados con el antígeno de
20 superficie de hepatitis B purificado a partir de sangre
humana, estando dicho anticuerpo exento de anticuerpos
residuales para las proteínas del suero humano, habien-
do sido purificado dicho anticuerpo poniendo en contacto
25 suero de conejillos de Indias que contienen anticuerpos



para el antígeno de superficie de hepatitis B con el extremo de alta densidad de un medio líquido que tiene un gradiente de densidad en el mismo, someter el medio líquido a ultracentrifugación hasta que se logre una distribución de equilibrio de los componentes del suero a través del gradiente de densidad y luego separar la fracción que contiene el anticuerpo específico para el antígeno de superficie de hepatitis B, conteniendo también dicha suspensión en solución en dicho medio acuoso normal suero de conejillos de Indias que no contiene anticuerpo específico para el antígeno de superficie de la hepatitis B, en el que la mejora comprende : (a) neutralizar todas las muestras de prueba positivas de dicha sangre por mezcla con el anticuerpo asociado a la hepatitis humana, (b) absorber el factor reumatoide en las muestras de prueba del paso (a) que contiene dicho factor por mezcla con perlas del látex revestidas con gamma-globulina humana y; (c) mezclar de nuevo dichas muestras de prueba positiva con más de dicha composición de diagnóstico en la que dichas partículas de poliestireno están revestidas con una cantidad de dicho anticuerpo específico para dicho antígeno de superficie de hepatitis B justo lo suficiente para impedir la autoaglomeración de dichas partículas de resina.

2ª.- Un método mejorado para determinar la presencia del antígeno de superficie de hepatitis B en la



sangre humana.

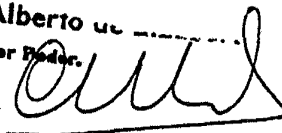
Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

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

Madrid, 27.AGO.1976

P.A.

Alberto de
Per Pedro.



VGD.

