



10 ES	11	NUMERO	10 A 1
	21	453136	
	22	FECHA DE PRESENTACION	
		9-11-76	

PATENTE DE INVENCION

P.- 64.152  
HOE 75/B 013

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
P 25 51 208.7	14-11-75	Rep.Fed.AL.

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	A61K	

64 TITULO DE LA INVENCION
"PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UN PREPARADO DE ERITROCITOS LIOFILIZABLE Y ESTABLE"

71 SOLICITANTE (S)
BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Marburg/Lahn, República Federal Alemana

72 INVENTOR (ES)
Dr. Hans Schweinsberg y Günter Zülch

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
D. ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ

El invento concierne a un preparado de eritrocitos liofilizable y estable, apropiado para el recubrimiento con antígenos, a un procedimiento para su preparación por tratamiento de los eritrocitos con un aldehído inferior y una sal de cromo, así como a su utilización, especialmente en un en sayo de hemoglutinación.

Desde hace largo tiempo se detectan anticuerpos por el ensayo de hemoglutinación pasivo o indirecto. En tales casos se utilizan glóbulos sanguíneos de las más diferentes especies de animales, la mayor parte de las veces del carnero, como vehículos para antígenos disueltos. Dado que los eritrocitos naturales son estables sólo por un período de tiempo corto, se ha llevado a cabo posteriormente un tra tamiento de las células con aldehídos (formaldehído, piru valdehído, glutarodialdehído) o ácido sulfosalicílico. Las células tratadas de este modo pueden ser conservadas durante largo tiempo. Son cargadas con el correspondiente antígeno sólo antes del uso.

Eritrocitos cargados de este modo con antígeno son estables en suspensión por lo general sólo en coloides, tales como por ejemplo soluciones que contienen suero, albúmina, gelatina. Dependiendo de la cantidad de las sustancias estabilizadoras presentes en el reactivo terminado y dispuesto para el uso, el suero a investigar puede ser empleado en un medio de sal común o en otros medios apropiados. La dura

ción de la posibilidad de utilización, dependiendo del antígeno utilizado, es desde horas hasta días. Una mejora de la estabilidad puede lograrse mediante secado por liofilización.

5 También se ha descrito ya tratar eritrocitos simultáneamente con cloruro de cromo trivalente y un antígeno, copulándose luego el antígeno con eritrocitos.

10 La copulación de antígenos con eritrocitos de carnero naturales, llevada a cabo por diferentes autores, en el caso de acción simultánea de antígeno y cloruro de cromo trivalente tiene desventajas esenciales, ya que las sales de cromo actúan tanto sobre la superficie de los eritrocitos como también sobre el antígeno añadido, y por consiguiente dificultan un ajuste óptimo de los reactivos.

15 En la preparación, almacenamiento y uso de preparados de eritrocitos recubiertos con antígenos todavía no se han resuelto toda una serie de problemas, por ejemplo el ajuste óptimo, que se acaba de mencionar, de la sensibilidad de detección de los antígenos de hemaglutinación. Tam-  
20 bién en lo que se refiere a la estabilidad de los eritrocitos en condiciones de almacenamiento y a la reproducibilidad dejan bastante que desear, a veces, las investigaciones de hemaglutinación llevadas a cabo de este modo.

25 Existía por lo tanto la misión de producir preparados de eritrocitos apropiados para el recubrimiento con

antígenos, que en el caso de la determinación cuantitativa proporcionen resultados satisfactorios y dignos de confianza en investigaciones de hemaglutinación, que puedan ser re producidos incluso en el caso de preparados que se almacenen durante largo tiempo.

Se ha encontrado ahora que puede lograrse una mejora esencial de los reactivos utilizables en ensayos de hemaglutinación, si sobre eritrocitos suspendidos en una solución tampón se hace actuar simultáneamente o en cualquier orden de sucesión de manera sucesiva un aldehído alifático inferior y una sal soluble en agua de cromo divalente o trivalente, se lavan los eritrocitos y en caso deseado se liofilizan. Después del lavado se puede aplicar en caso deseado un antígeno para diagnóstico sobre el preparado de eritrocitos obtenido .

Como eritrocitos se utilizan preferiblemente eritrocitos de pájaros con contenido de nucleolos. Por utilización de los eritrocitos de pájaros con contenido de nucleolos celulares se llega a una aceleración de la sedimentación y al mismo tiempo, por consiguiente, a muestras de sedimentación más fáciles de interpretar. Por consiguiente se establece una evaluación rápida y segura de la reacción.

El tratamiento de las células con una sal de cromo mejora sobre todo esencialmente su aptitud para el almacenamiento a alrededor de 37°C. Otra ventaja de los eritrocitos

5 tratados de acuerdo con el invento se encuentra en la pequeña tendencia a reacciones positivas no específicas, con lo cual en la mayor parte de los casos se hace superflua la utilización de un reactivo de control. Especialmente los eritrocitos tratados de aves se caracterizan por una capacidad de reacción rápida, sensible y específica en ensayos de hemaglutinación, así como también por estabilidad en forma líquida o secada por liofilización.

10 Los eritrocitos de aves previamente tratados con aldehidos y sales de cromo son apropiados para la adsorción de los más diferentes antígenos de bacterias, parásitos y virus, y hacen posible también una acumulación de anticuerpos para la detección de antígenos.

15 Es objeto del invento en primer término el procedimiento para la producción de un preparado de eritrocitos estable y apropiado para el recubrimiento con antígenos. Para ello se recogen eritrocitos naturales en la sangre plena de diferentes animales así como de hombres, pero preferiblemente de la que contienen nucleolos tal como la de pájaros, tales como gallinas, palomas y pavos. La muestra de sangre es mezclada con sustancias habituales inhibidoras de la coagulación, después de lo cual se obtienen los eritrocitos, por ejemplo por centrifugación, y se lavan varias veces con soluciones tampón isotónicas compatibles, con el fin de eliminar los antígenos todavía presentes en la sangre. El se

20

25

dimento lavado de eritrocitos es suspendido en una cantidad no menor de 8 partes en volumen de una solución tampón neutra isotónica o de una solución salina isotónica. A esta suspensión se añade una solución acuosa de un aldehído alifático inferior, preferiblemente de uno que tiene una longitud de cadena desde C 1 hasta C 6, tal como formaldehído, metilglicoxal o glutaraldehído en una cantidad de 0,2 a 10% en peso de aldehído referido al volumen presente del sedimento de eritrocitos. El tiempo de reacción para la acción del aldehído sobre los eritrocitos depende de la temperatura de reacción y de la concentración empleada del aldehído. Convenientemente se mantienen las condiciones de reacción que endurecen a los eritrocitos, sin que se llegue a la formación de aglomerados. La formación de aglomerados puede ser observada por microscopio.

En este sentido se mantienen en general tiempos de reacción de 1 a 24 horas a temperaturas de 5 - 45°C. De acuerdo con condiciones preferidas en el caso de la utilización de formaldehído, que es usual en el comercio en forma de solución aproximadamente al 35%, se hace actuar sobre la suspensión de eritrocitos una solución de formaldehído previamente diluída a aproximadamente 10-15%. En particular, se puede proceder siguiendo la propuesta de L. Csizmas, Proc. Exp. Biol. Med. 103, páginas 157 y siguientes (1960). El ejemplo 1 expuesto explica el principio del procedimiento. A con

5 continuación del tratamiento con aldehído los eritrocitos son lavados varias veces. Caso de que no deban ser tratados uteriormente de modo inmediato, los eritrocitos tratados previamente de este modo pueden ser mezclados con un agente con actividad antimicrobiana, por ejemplo timerfonato de sodio en una concentración de 0,01 - 0,05 %, y conservados a 4°C en forma de suspensión al 10-30%, preferiblemente al 25%.

10 Para el tratamiento con una sal de cromo divalente o cromo trivalente, los eritrocitos tratados con aldehído son suspendidos en un medio acuoso. Convenientemente se utiliza para ello agua. La concentración de los eritrocitos es de 0,5 - 25%, preferiblemente 1,25%. A esta suspensión de eritrocitos se añade una solución acuosa de sal de cromo en una concentración de 0,0001 - 2,0% y después del mez-  
15 clado se mantiene durante 5 - 30 minutos a 5-45°C. Después de ello, los eritrocitos son separados por sedimentación o centrifugación. Para la eliminación de sal de cromo en exceso se lava varias veces.

20 Como sales de cromo en el sentido del invento entran en consideración todas las sales de cromo divalente y de cromo trivalente que sean solubles en agua, tales como cloruros, sulfatos, nitratos, fosfatos o acetatos de cromo divalente o de cromo trivalente.

25 El orden de sucesión de la utilización de aldehído y sal de cromo puede ser intercambiado sin influencia des-

ventajosa sobre los resultados. Con igual éxito pueden pasar a utilizarse al mismo tiempo el aldehído y la sal de cromo.

5 Los eritrocitos tratados con formaldehído y sal de cromo obtenidos de este modo son apropiados para ser recubiertos con diferentes antígenos.

En general, los eritrocitos estabilizados son recubiertos con antígenos en una solución acuosa, que es ajustada a un valor de pH por debajo de 7, convenientemente a un valor de pH débilmente ácido entre 5,5 y 6,5. Como antígenos deben entenderse las más diferentes sustancias, cuya detección en la sangre o en la orina sea interesante. A los antígenos escogidos a título de ejemplo, que pueden ser utilizados con éxito para revestir los preparados de eritrocitos estabilizados, pertenecen especialmente antígenos proteínicos, sobre todo los antígenos proteínicos de plasma de origen humano o animal, antígenos microbianos, por ejemplo antígenos toxoplásmicos, como se pueden obtener por ejemplo por acción de ultrasonidos, o antígenos de *Treponema*-  
15 *pallidum*, que se obtienen a partir de testículos de conejo infectados, y otros. Una ventaja especial del preparado de eritrocitos del presente invento consiste en que es apropiado para revestir sustancias con diferentes estructuras químicas.

25 Los eritrocitos estabilizados recubiertos con los

antígenos son suspendidos convenientemente en una solución que contiene un coloide liofilizado, por ejemplo una solución al 0,1 - 1% de goma arábiga o una correspondiente solución de un producto de degradación de gelatina o polivinilpirrolidona convenientemente en presencia de otras sustancias estabilizadoras tales como aminoácidos, por ejemplo glutamato de sodio, o glicina en una concentración de 1 - 10% y/o de un suero animal en una concentración de 0,5 - 20%. En este líquido de suspensión, el reactivo puede ser almacenado en estado líquido a temperatura de nevera, es decir a aproximadamente 4°C, o también puede ser secado por liofilización después de la congelación. Tras haber disuelto el preparado secado en agua destilada, el reactivo está a disposición para la realización de ensayos de hemaglutinación con la misma calidad que se presentaba antes del secado.

La realización de las investigaciones de hemaglutinación es conocida para el experto en la materia. En general se mezcla para ello una muestra de suero, que contiene los anticuerpos supuestos, con el correspondiente preparado de eritrocitos recubierto con antígenos en un medio acuoso, con el fin de determinar si se establece una aglutinación. La reacción de aglutinación se lleva a cabo ventajosamente en placas de microvaloración. Para ello se mezclan por ejemplo 0,05 ml. de suero o de dilución de suero

con 0,025 ml de los eritrocitos (al 1,25%) recubiertos con antígeno de acuerdo con el invento, y se agita durante 30 segundos hasta 1 minuto. En el caso de utilización del procedimiento precedentemente descrito para la preparación de los eritrocitos recubiertos, la interpretación de los resultados de ensayo puede efectuarse ya tras 30 minutos.

Tal como arriba se ha explicado, los preparados de eritrocitos estabilizados de acuerdo con el invento pueden ser recubiertos con antígenos proteínicos. Esto significa que pueden ser revestidos también con un anticuerpo específico, de manera que en el caso de subsiguiente investigación por hemaglutinación los eritrocitos se aglutinan en presencia del correspondiente antígeno específico. El ensayo de hemaglutinación pasivo puede ser utilizado para detectar infecciones bacterianas, para descubrir infecciones de virus, para la determinación de la compatibilidad histológica, para el descubrimiento de enfermedades de autoinmunidad y otros fenómenos comparables.

El invento se va a explicar con más detalle con ayuda de los siguientes ejemplos de realización.

#### Ejemplo 1.

##### a) Estabilización de los eritrocitos

300 ml de sangre de gallina son recogidos en 100

ml de solución al 3,5% de citrato, y tratados todavía en el mismo día.

Los eritrocitos son separados por centrifugación con 2.000 x g ( g = aceleración de la gravedad) y son lavados 5 veces en 10 volúmenes de solución fría ( a aproximadamente 10°C) al 0,85% de NaCl. En tal caso debe evitarse la formación de espuma. El sedimento celular lavado es suspendido en 8 volúmenes de solución al 0,85% de NaCl con un pH de 6,8. 1/4 del volumen de la suspensión celular de una solución al 14% de formaldehído con pH 5,5 es vertida en una manguera para diálisis de celofán (anchura 2,5 cm) y se cierra junto a un extremo. En tal caso se mantiene vacío aproximadamente 1/3 de la manguera. El aire es expulsado, el extremo abierto es cerrado y atado, la manguera es colocada sobre el fondo de un vaso de precipitados y la suspensión de eritrocitos es vertida por encima de ella. El vaso es movido a la temperatura ambiente sobre un agitador mecánico (orbital shaker). La velocidad es regulada de manera que se logra un intenso mezclado con la mínima formación de espuma posible. Después de 3 horas se retira el saco de celofán, su contenido se vierte en el vaso y se agita durante 16-18 horas más. Después de ello se encuentran residuos de células en forma de grumos sobre la superficie del líquido y junto a las paredes del vaso, los cuales pueden ser eliminados por cuidadosa decantación.

A la suspensión homogénea de células se vierten 1/2 volúmenes de solución isotónica de NaCl y luego se lava 6 veces cada vez con 750 ml. Finalmente el sedimento celular lavado, tratado con formalina, es suspendido en solución de sal común tamponada con fosfato, de pH 7,2 (PBS), con 0,02% de timerfonato de sodio, de manera que resulta una solución al 25% que es conservada a 4°C.

Para el tratamiento con  $\text{CrCl}_3$  de los eritrocitos estabilizados, lavados y tratados con aldehído, éstos son suspendidos en una solución de sal común, de pH 7,5, tamponada, diluída, aproximadamente de 1:4. A esta suspensión se añade un volumen igual de una solución acuosa de cloruro de cromo trivalente en una concentración de 0,002% y la carga se mantiene a 37°C durante 10 minutos. Después de ello se elimina la sal de cromo lavando varias veces en solución fisiológica de sal común.

b) Recubrimiento con antígeno

1. Un extracto de antígeno obtenido por acción de ultrasonidos ( 2 x 1 min. 22 KHz) a partir de toxoplasmas y purificado por centrifugación con respecto de componentes en partículas, es mezclado en dilución apropiada, la cual es determinada en un ensayo previo, con la suspensión de eritrocitos (al 1,25%) tratada con cloruro de cromo trivalente y aldehído, y es mantenida a 37°C durante un tiempo de acción de 1 hora. El valor del pH es mantenido en

tal caso en 6,4.

Después de ello se efectúa un lavado en dos veces en solución al 0,1 - 1% de goma arábiga y la suspensión del sedimento en tampón m/15 de trishidroximetil-aminometano-HCl de pH 8,0, a la que se ha añadido 5% de glutamato de sodio y 15% de suero de conejo.

La suspensión contiene 1,25% de eritrocitos.

En este líquido de suspensión y estabilizador puede ser almacenado el reactivo en estado líquido a +4°C o puede ser secado por liofilización. La disolución se efectúa en el volumen original de agua destilada.

2.- De modo correspondiente se puede preparar un reactivo de Lues, empleando, en lugar de un extracto por ultrasonidos de toxoplasmas, un extracto de *Treponema pallidum* de testículos de conejo infectados, y llevando a cabo la dilución de suero en un medio de absorción.

#### Ejemplo 2.

Eritrocitos de cordero recientemente obtenidos son suspendidos en el volumen doble de la solución de Alsever con la siguiente composición:

20,5 g de dextrosa;

8 g de citrato de sodio ( $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ );

0,552 g de ácido cítrico ( $\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ );

4,2 g de cloruro de sodio  
hasta 1.000 ml con agua destilada.

5 Después de ello los eritrocitos son separados por centrifugación a aproximadamente 2.000 x g y lavados cinco veces en 10 partes en volumen de solución de sal común 0,15 molar tamponada con fosfato y fría con un valor de pH de 7,2. Después del lavado los eritrocitos son suspendidos hasta llegar a una concentración de 8% (en volumen/volumen) en solución 0,15 molar de sal común tamponada  
10 con un valor de pH 7,2. A una parte en volumen de esta suspensión de eritrocitos se añade el mismo volumen de una solución al 3% de glutarodialdehído en solución tamponada de sal común con un valor de pH 7,2, gota a gota, agitando lentamente la suspensión de células. Después de ello  
15 se agita durante 17 horas a la temperatura ambiente, la suspensión se lava seguidamente cinco veces con solución tamponada de sal común de pH 7,2, y se vuelven a suspender en solución de sal común los eritrocitos tratados con aldehído, de manera que resulta una suspensión al 15% (en volumen/volumen) de los eritrocitos estabilizados de este modo.  
20

25 Para el tratamiento con cloruro de cromo divalente de los eritrocitos estabilizados, tratados con aldehído y lavados, éstos son suspendidos en una solución de sal común tamponada, diluída a aproximadamente 1:4, de pH 7,2.

A esta suspensión se añade un volumen igual de una solución acuosa de cloruro de cromo divalente en una concentración de 0,05 %, y la carga es mantenida durante 30 minutos a 37°C. Después de ello se elimina la sal de cromo lavando varias veces con solución fisiológica de sal común.

El recubrimiento con antígeno puede llevarse a cabo del mismo modo que se describe en el Ejemplo 1 b).

Preparados apropiados de eritrocitos para el recubrimiento con antígenos se obtienen también si se utiliza metilglioxal en lugar de glutarodialdehído, tal como se expone en el presente ejemplo.

#### REIVINDICACIONES

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

1ª.- Procedimiento para la producción de un pre-

5 parado de eritrocitos liofilizable y estable, caracterizado porque sobre eritrocitos suspendidos en una solución acuosa isotónica se hacen actuar, simultáneamente o en cualquier orden de sucesión de manera sucesiva, un aldehído alifático inferior y una sal soluble en agua de cromo divalente o cromo trivalente, se lavan los eritrocitos y en caso deseado se liofilizan.

10 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque en calidad de aldehído alifático inferior se utiliza un aldehído con 1 a 6 átomos de carbono.

3ª.- Procedimiento según la reivindicación 2ª, caracterizado porque el aldehído alifático inferior es utilizado en una concentración de 0,1 - 10% (en peso/volumen).

15 4ª.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1ª a 3ª, caracterizado porque las sales de cromo solubles en agua de la suspensión de eritrocitos son utilizadas en una concentración de 0,001-2%.

20 5ª.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1ª a 4ª, caracterizado porque en calidad de sal de cromo soluble en agua se utiliza cloruro de cromo divalente.

6ª.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1ª a 5ª, caracterizado porque en calidad de sal de cromo soluble en agua se utiliza cloruro de cromo trivalente.

25 7ª.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1ª a 6ª, caracterizado porque el aldehído o la sal de

1 romo actúan a aproximadamente 5°C hasta aproximadamente  
45°C.

5 8a.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1a a 5a, caracterizado porque sobre los eritrocitos se hacen actuar el aldehído durante 1-24 horas y la sal de cromo soluble en agua durante 5-30 minutos.

10 9a.- Procedimiento según las reivindicaciones 1a a 8a, caracterizado porque eritrocitos tratados con aldehído y una sal soluble en agua de cromo divalente o trivalente se ponen en contacto en solución acuosa débilmente ácida con un antígeno, se elimina por lavado el antígeno en exceso y los eritrocitos se vuelven a suspender en una solución que contiene un coloide liofilizado.

15 10a.- Procedimiento según la reivindicación 9a, caracterizado porque para el recubrimiento se utiliza un antígeno de toxoplasma.

11a.- Procedimiento según la reivindicación 9a, caracterizado porque para el recubrimiento se utiliza un antígeno de *Treponema pallidum*.

20 12a.- Procedimiento para la producción de un preparado de eritrocitos liofilizable y estable.

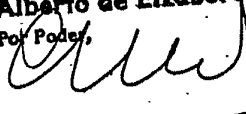
Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

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

Madrid, 10. AGO. 1977

P.A.

**Alberto de Elizaburu**  
Por Poder.



A handwritten signature in dark ink, appearing to be 'A. de Elizaburu', written over a horizontal line. The signature is stylized and cursive.