



ESPAÑA

19 ES	11 21	NUMERO 456.913	10 A1
	22	FECHA DE PRESENTACION 16 marzo 1.977	

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO 667.316	32 FECHA 16.3.1976	33 PAIS Estados Unidos
---	-----------------------	---------------------------

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL C07G//A61K	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	--	--------------------------------------

54 TITULO DE LA INVENCION UN METODO PARA LA PREPARACION DE ERITROCITOS ESTABILIZADOS.
--

71 SOLICITANTE (S) ORTHO DIAGNOSTICS, INC.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE Raritan, New Jersey - Estados Unidos.
--

72 INVENTOR (ES) Frank Falkowski y Leonard Wilson, ambos de nacionalidad estadounidense.

73 TITULAR (ES) El mismo solicitante.
--

74 REPRESENTANTE DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU.
--

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

20 JUN 1978

1

RESUMEN DE LA INVENCION

5

10

15

20

25

30

Se describe un procedimiento de doble tratamiento con aldehídos de eritrocitos. Los eritrocitos de diversos orígenes pueden ser tratados en un procedimiento en dos etapas para hacerlos estables y posteriormente útiles en los sistemas de detección de antígenos-anticuerpos. Se utiliza glioxal como primer medio de tratamiento, seguido de una segunda etapa de tratamiento utilizando formaldehído o glioxal como fijador. El glioxal se utiliza en la primera etapa en proporciones que oscilan entre 0,1 y 0,4 g por cada 0,8 ml de Volumen Celular Compacto de eritrocitos, seguido de la segunda etapa de tratamiento, en la que se utiliza como mínimo 0,1 g de formaldehído o glioxal y preferiblemente de 0,1 a 0,6 g por cada 0,8 ml de Volumen Celular Compacto de eritrocitos tratados. El medio de reacción es preferiblemente acuoso hipertónico y todavía mejor es un medio de citrato sódico. Las células tratadas pueden ser utilizadas en la detección del antígeno asociado con la hepatitis, en un ensayo de hemoaglutinación pasiva inverso.

Esta invención se refiere al tratamiento de materiales celulares biológicos y más especialmente al tratamiento de los eritrocitos. Específicamente, se refiere a la fijación de eritrocitos utilizando una técnica de revestimiento en dos etapas consecutivas en la que intervienen ciertos materiales aldehídicos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En el campo de la diagnosis médica, muy frecuentemente conviene utilizar eritrocitos que ayudan a detectar antígenos o anticuerpos en un humor ensayado. El eritrocito en este caso se utiliza como partícula portadora de un antígeno o anti

1 cuerpo unido a ella. Como es sabido, cuando se pone en con-
tacto un material antigénico con un anticuerpo que es espe-
cífico de ese material, tiene lugar una reacción antígeno-
anticuerpo. En algunos sistemas, esta reacción es perceptible
5 visiblemente, formando un complejo antígeno-anticuerpo que
puede ser distinguido a simple vista o con ayuda de un equi-
po visual de laboratorio. En otros casos, sin embargo, aunque
se produce una reacción antígeno-anticuerpo, el producto de
reacción no es discernible a simple vista ni con ayuda de
10 equipo auxiliar a cualquier nivel conveniente. En situaciones
como éstas, es muy útil proporcionar un medio en partículas
como vehículo del antígeno o del anticuerpo de manera que
la subsiguiente reacción con el correspondiente formador de
complejo pueda ser observada visualmente debido a que se pro-
duce el arracimamiento o aglutinación de las partículas.
15

Se han utilizado diversos materiales en partículas co-
mo base a la que fijar el antígeno o el anticuerpo para su
posterior reacción, tales como partículas de látex como es-
tireno, butadieno, polímeros acrílicos y diversas células de
20 la sangre como eritrocitos humanos y animales (glóbulos ro-
jos). Los eritrocitos son un componente muy frágil y delica-
do de la sangre, constituyendo el medio básico sobre el que
son transportados los antígenos a través del sistema del
huésped. Por ejemplo, se sabe que los glóbulos rojos humanos
25 son portadores de una amplia variedad de diversos antígenos,
cuya naturaleza y composición da lugar a una huella que es
útil para determinar qué clase de sangre podría tolerar un
receptor en una transfusión.

30 Cuando se utilizan glóbulos rojos para detectar una
reacción antígeno-anticuerpo, la aglutinación resultante se

1 denomina hemoaglutinación y cuando los glóbulos rojos se
utilizan para transportar un anticuerpo más que un antígeno para detectar un antígeno sospechado en el suero del huésped, el fenómeno se denomina hemoaglutinación pasiva
5 inversa.

Como ilustración de la hemoaglutinación pasiva inversa citaremos el conocido sistema de detección de la presencia del antígeno asociado a la hepatitis en el suero de un paciente. La dificultad del uso de glóbulos rojos en dicho
10 sistema de hemoaglutinación, o realmente en cualquier sistema de detección antígeno-anticuerpo, es que los glóbulos rojos son extraordinariamente frágiles, delicados e inestables.

Si los glóbulos rojos se dejan en suspensión en un medio isotónico, se lisan dentro de unos 21 días. Es decir,
15 la estructura de soporte de los glóbulos rojos comienza a debilitarse y produce la pérdida de hemoglobina al medio. De esta forma se produce una lisis de las células, haciendo que el material sea totalmente inadecuado para cualquier aplicación en un sistema de detección de la aglutinación.

20 Esta invención se refiere al tratamiento de los glóbulos rojos para aumentar su estabilidad y permitir su aplicación en los sistemas de detección de una reacción antígeno-anticuerpo. Este proceso de tratamiento de los glóbulos rojos de la sangre se denomina fijación.

25

ESTADO DE LA TECNICA ANTERIOR

30

La fijación de los eritrocitos para aumentar su estabilidad es una técnica muy conocida. Naturalmente, en la selección de los agentes fijadores apropiados, ha de tenerse cuidado de que los fijadores no contribuyan por sí mismos a la lisis de los eritrocitos en cualquier grado intolerable o

1 no ejerzan ningún efecto perjudicial sustancial sobre los
sistemas de aglutinación subsiguientes. Aunque no se com-
prende bien el fenómeno de la protección celular, se cree
que el fijador produce una reacción química con los componen-
5 tes proteicos situados en la superficie de la célula, dando
lugar a una célula protegida.

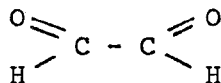
En la patente estadounidense 3.714.345, de 30 de Ene-
ro de 1973, los inventores describen un procedimiento de do-
ble tratamiento con aldehído para recubrir los eritrocitos,
10 utilizando aldehído pirúvico en una primera etapa del tra-
tamiento, seguido de formaldehído en una segunda etapa. El
autor afirma que esta estabilización es eficaz sin altera-
ción aparente de la capacidad de las células tratadas de
reaccionar con el antisuero A o antisuero B. Es decir, el autor
15 alega que la estabilización no es efectiva para reducir este
aspecto de la antigenicidad de los glóbulos rojos de la sangre.

Otras publicaciones han descrito diversas técnicas de
fijación. Por ejemplo, Ling en Brit.J.Haemat. (1961) 7, pág.
20 299, describe el tratamiento de los glóbulos rojos con formal-
dehído, aldehído pirúvico, glioxal, dialdehído glutárico y
ácido glioxílico. El autor indica que el aldehído pirúvico
es el aldehído preferido para fijar los glóbulos rojos de
la sangre. El uso de grandes cantidades de glioxal produce
una célula tratada que no puede ser utilizada consistente y
25 fiablemente como base para la unión de las proteínas del sue-
ro (tales como antígenos y anticuerpos). El autor llega a la
conclusión de que la técnica con glioxal es inadecuada. Con
las células tratadas con glioxal la estabilidad no era buena
al cabo de 6 meses al contrario de lo que ocurría con el
30 aldehído pirúvico.

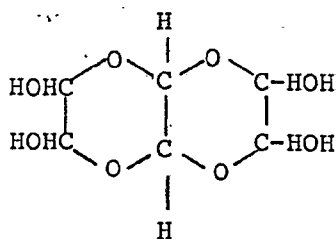
1 Los glóbulos rojos también han sido tratados con so-
luciones de peroxisales (Chem. Abstracts {1961}, pág. 27495)
y utilizados en sistemas de aglutinación de antígenos-anti-
cuerpos (Chem. Abstracts {1961}, pág. 20672).

5 DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

De acuerdo con esta invención, se ha descubierto aho-
ra que los eritrocitos pueden ser estabilizados mediante un
tratamiento en dos etapas, que consiste en poner en contac-
to las células con una cantidad de glioxal en una primera
10 etapa de tratamiento, seguido de contacto de las células
tratadas con una cantidad de formaldehido o glioxal en una
segunda etapa de tratamiento. El glioxal es un aldehido que
puede existir en forma de monómero, dímero, trímero o polí-
mero. El monómero puede ser descrito estructuralmente así:



El material es un sólido y se encuentra en el mercado
en forma de trímero sólido dihidratado, con 3 moles de glioxal y 2 moles de agua por mol de trímero, como sigue:



25 o como solución acuosa al 40 % (calculado sobre el peso de
glioxal libre monomérico). El formaldehido se encuentra en
la mayoría de los casos en forma de solución acuosa de for-
maldehido gaseoso, que puede adquirirse en el mercado como
formalina, al 40 % en peso/volumen (40 g de formaldehido
30 por 100 ml de solución acuosa).

1 La cantidad de glóbulos rojos en cualquier volumen de
líquido, ya procedan las células de corderos, pavos, conejos,
seres humanos o cualquier otro animal, se expresa convenientemente en función del volumen que ocupan. Una medida útil
5 de la cantidad de glóbulos rojos de la sangre en cualquier suspensión líquida de estas células es el volumen de células expresado como porcentaje del volumen total de la suspensión líquida en una muestra dada. Este parámetro es denominado hematócrito o volumen celular compacto y da una indicación fiable de los glóbulos rojos ya que proporciona un denominador común para designar los volúmenes. El hematócrito es un parámetro determinado por un método normalizado y se expresa como un porcentaje. Así, un hematócrito del 40 %
10 significa que los glóbulos rojos de la sangre en 100 ml de una suspensión líquida de glóbulos rojos ocupan 40 ml. Es decir, el volumen celular compacto es de 40 ml. Por lo tanto, puede verse que si se duplica el volumen de la suspensión líquida, mientras que el volumen de los glóbulos rojos en esta suspensión permanece igual, el hematócrito será la
15 mitad del original, es decir, 20 % en el caso del ejemplo dado anteriormente.

 El hematócrito se determina convencionalmente utilizando el macrométodo normalizado de laboratorio de Wintrobe, descrito en Clinical Diagnosis By Laboratory Methods, 14 edición, W.B. Saunders Company (Publishers), editado bajo la
25 dirección de Israel Davidsohn, M.D., F.A.C.P. y John Bernard Henry, M.D. En la pág. 146 de esa obra de referencia, el macrométodo está descrito como sigue:

30 "EQUIPO. El tubo hematócrito Wintrobe es un tubo de vidrio de paredes gruesas con un diámetro interno uniforme

1 y un fondo plano. Está graduado en milímetros desde 0 hasta 105 y dispone de un tapón de goma para evitar la evaporación durante el largo periodo de centrifugación.

5 De las diversas formas de pipetas de llenado existentes, una jeringa de 2 ml con una aguja suficientemente larga para llegar al fondo del tubo hematócrito es probablemente tan buena como cualquiera y bastante práctica.

10 El requisito esencial de una centrífuga es que genere un campo centrífugo no inferior a 2500 G en el fondo de la vasija".

15 "REACTIVO. Como anticoagulante, es satisfactorio la heparina seca, el oxalato equilibrado o el EDTA. Si se introduce en el tubo una cantidad inadecuada de sangre, dando lugar a un exceso de oxalato o de EDTA, los eritrocitos se encogen y el hematócrito resultará falsamente bajo".

20 "PROCEDIMIENTO. La sangre oxalatada o heparinizada debe mezclarse bien mediante no menos de 30 inversiones lentas y completas de la vasija. No es adecuado hacer rodar el frasco y todavía es peor sacudirlo debido a que pueden dañarse las células".

25 "Después de mezclar adecuadamente, el tubo hematócrito se llena utilizando la pipeta de llenado o una jeringa, preferiblemente en una sola operación. La punta de la pipeta se introduce en el fondo del tubo. A medida que transcurre el llenado, se eleva la punta de la pipeta pero permanece por debajo del menisco ascendente de la sangre con objeto de evitar la formación de espuma. Debe anotarse el nivel de la sangre y taparse los tubos para evitar la evaporación durante la centrifugación necesaria durante 30 minutos a 2500 G".

30 "La lectura se realiza sin perturbar la muestra. El re-

1 sultado se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Hematócrito (\%)} = \frac{100 L_1}{L_2}$$

5 donde L_1 es la altura de la columna de glóbulos rojos en mm y L_2 es la altura de la muestra de sangre completa (glóbulos rojos y plasma). La capa blanca grisácea de leucocitos y plaquetas por encima de los eritrocitos no se incluye en el valor de " L_1 ".

10 De acuerdo con esta invención, se ha encontrado que la cantidad de glioxal y formaldehído utilizada en las etapas de tratamiento puede ser relacionada convenientemente a una unidad de la medida del hematócrito utilizando la técnica antes descrita. Un valor hematócrito dirá al experto en la técnica cual es el volumen compacto de glóbulos rojos.

15 Este volumen no variará normalmente de una muestra a otra de sangre en un grado significativo en lo que se refiere a esta invención, siempre que las condiciones de centrifugación de las muestras sean esencialmente equivalentes. Así, un hematócrito obtenido, por ejemplo, sobre eritrocitos de cordero

20 puede ser comparado con un hematócrito obtenido sobre eritrocitos de pavo o eritrocitos humanos en lo que se refiere a la determinación de la cantidad de fijador a utilizar en la puesta en práctica de esta invención. En el sentido utilizado aquí, el valor hematócrito significa el volumen celular compacto de glóbulos rojos utilizando el macrométodo de

25 Wintrobe, a una fuerza de 2500 G como mínimo, durante 20-30 minutos. Además, el término "Volumen Celular Compacto" cuando se utiliza aquí significa el volumen de glóbulos rojos obtenido bajo las condiciones anteriores, salvo indicación

30 en contrario en el texto.

1

Un valor hematócrito conveniente para practicar esta invención es el de 8 %. Esto corresponde a 0,8 ml de volumen celular compacto por cada 10 ml de suspensión líquida de glóbulos rojos. Esta concentración da una suspensión líquida convenientemente manipulable de glóbulos rojos que es mucho menos viscosa que la sangre completa pero suficientemente concentrada para tratar cantidades importantes de células.

5

10

De acuerdo con esta invención, la cantidad de glioxal utilizada en la primera etapa del tratamiento está comprendida entre 0,1 y 0,4 g y preferiblemente entre 0,1 y 0,3 g de glioxal por cada 0,8 ml de volumen celular compacto. Lo más conveniente es suministrar la cantidad apropiada de glioxal en forma de una solución diluída del mismo, del orden del 1 al 4 % (1-4 g de glioxal {calculado sobre el monómero libre} disueltos por cada 100 ml de solución). Esto se consigue adecuadamente diluyendo el glioxal comercial al 40 % hasta la concentración apropiada.

15

20

En la puesta en práctica del procedimiento de esta invención, los glóbulos rojos de la sangre se seleccionan dependiendo en alto grado de la reacción antígeno-anticuerpo subsiguiente para cuya detección serán empleados. En muchas situaciones, son convenientes los glóbulos humanos pero son igualmente adecuados los eritrocitos de cordero, caballo, pollo, pavo y conejo. El contacto de los eritrocitos con el glioxal se realiza en presencia de un medio acuoso, que tiene un grado de tonicidad esencialmente compatible con la integridad de las células, preferiblemente en un medio hipertónico, tal como una solución de citrato sódico, durante periodos que oscilan preferiblemente entre 18 y 24 horas. Unos periodos más cortos y más largos habitualmente no producen nin-

25

30

1 gún beneficio adicional. La temperatura de reacción es normalmente de 18-25°C, siendo preferida la temperatura ambiente.

5 La concentración real de citrato sódico en el medio final dependerá de diversos factores tales como las diluciones del aldehído, los eritrocitos particulares utilizados y similares. Es conveniente que el medio acuoso contenga citrato sódico (calculado sobre el dihidrato) en una proporción del 4,5 al 5 % en peso/volumen.

10 La primera etapa del tratamiento de esta invención es un acontencimiento crítico en la estabilización de los eritrocitos. Los delicadísimos y frágiles eritrocitos no tratados se convierten en esta etapa en una forma más estable, capaz de tolerar variaciones del ambiente y condiciones que las células no tratadas no podrían soportar. A la vista de este resultado, las condiciones de la segunda etapa del tratamiento pueden variar dentro de límites más amplios y más drásticamente que las de la primera etapa, como se verá más adelante.

20 Después del tratamiento de la primera etapa, las células se lavan para liberarlas de cualquier célula hemolizada que pudiera haberse producido, habitualmente con una solución salina isotónica, y después se tratan en la segunda etapa con formaldehído o con glioxal, a niveles de como mínimo 0,1 y preferiblemente de 0,1 a 0,6 y todavía mejor de 0,1 a 0,3 g por cada 0,8 ml de volumen celular compacto. Este tratamiento se realiza convenientemente bajo las mismas condiciones que el primer tratamiento con glioxal, aunque unas concentraciones del segundo aldehído situadas en el extremo superior del intervalo dado suelen requerir unos tiempos de tratamiento más cortos. Una vez completado el segundo tratamiento, las

25

30

1 células se lavan utilizando preferiblemente un medio de lavado salino o tampón y entonces están dispuestas para ser revestidas con antígeno o anticuerpo para su posterior uso en un sistema de detección.

5 Las células tratadas de acuerdo con esta invención han conservado su estabilidad a 5°C durante más de 8 meses, no han presentado ningún indicio de hemólisis y son adecuadas para el revestimiento con antígenos o anticuerpos. Esto contrasta con la situación obtenida con las células no tratadas, donde la hemólisis comienza casi inmediatamente y habitualmente es completa en unos 21 días.

10 Además, las células tratadas conservan su capacidad de ser revestidas con anticuerpos o antígenos y reaccionan específicamente. Por ejemplo, el anticuerpo o el antígeno puede ser unido a la célula tratada de acuerdo con técnicas muy conocidas. Pueden utilizarse diversos antígenos y anticuerpos como gonadatropina coriónica humana, anticuerpo de la hepatitis, fibrinógeno, albúmina, gammaglobulina y similares.

15 Las condiciones antes establecidas para determinar el hematócrito fueron presentadas para

a) dar una norma para todas las fuentes de glóbulos rojos, y

20 b) utilizar los procedimientos de laboratorio más comúnmente encontrados. Si se emplean condiciones de determinación diferentes o si se utilizan contadores electrónicos de células, que resultan en un volumen compacto de glóbulos rojos diferente del obtenido utilizando las condiciones de Wintrobe antes citadas, debe establecerse una relación entre este volumen compacto de glóbulos rojos y el hematócrito ob-

1 tenido en las condiciones de Wintrobe prescritas para calcular la cantidad de fijadores a utilizar aquí.

5 Los tampones o diluyentes aquí utilizados pueden ser cualquiera de los materiales biológicamente adecuados, normalmente empleados en este campo, que son esencialmente compatibles con la integridad de las células. El término "biológicamente adecuados" significa compatibilidad con los antígenos o anticuerpos encontrados y con la no lisis de los eritrocitos. Pueden utilizarse sustancias como soluciones
10 salinas normales, citrato sódico y similares. Las más preferidas son las soluciones de citrato sódico al 4,5-5 % en peso/volumen aproximadamente.

EJEMPLO 1

15 Se recogen 100 ml de sangre tipo O, Rh negativo, de un donante humano, en un medio anticoagulante normal de ácido-citrato-dextrosa (ACD). Las células se lavan cuatro veces con 10 volúmenes de solución salina isotónica. Las células se suspenden de nuevo en uno de los dos tampones indicados a continuación, a una concentración de 8 % de hematócrito
20 (utilizando el macrométodo Wintrobe). Los tampones tienen la siguiente composición:

- 25 1. Citrato - solución acuosa al 5,0 % en peso/volumen de citrato sódico. $2H_2O$, con un pH de 8,7 y
2. Fosfato - 16,18 g de Na_2HPO_4 anhidro - 4,9 g de KH_2PO_4 anhidro, pH 7,2 (0,15M).

30 Se preparan varias diluciones de glioxal acuoso al 40 % (calculado sobre el monómero libre), como se indica en la tabla siguiente, utilizando el tampón indicado. Después se mezclan 10 ml de la solución de glioxal tamponada con 10 ml de suspensión celular. Así, en cada caso, se ponen en contac

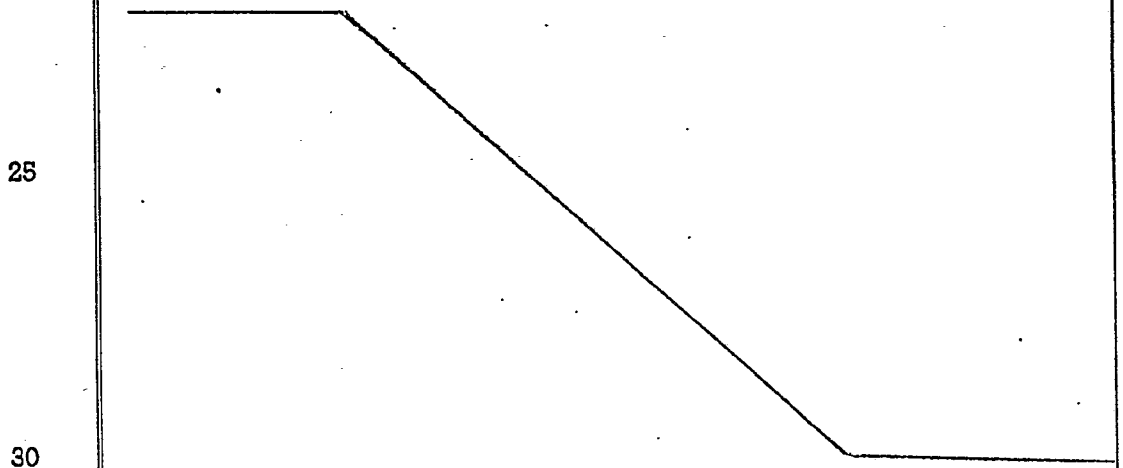
1 to 0,8 ml de volumen compacto de glóbulos rojos con la cantidad indicada de glioxal.

	<u>Glioxal,</u> <u>%</u>	<u>Glioxal,</u> <u>g</u>	<u>Tampón del</u> <u>aldehído</u>	<u>Tampón de las</u> <u>células</u>	
5	A	4	0,4	cittrato	cittrato
	B	4	0,4	cittrato	cittrato
	C	4	0,4	cittrato	cittrato
	D	4	0,4	cittrato	cittrato
	E	6	0,6	cittrato	cittrato
10	F	1	0,1	fosfato	fosfato
	G	3	0,3	fosfato	fosfato
	H	5	0,5	fosfato	fosfato

15 Las muestras se mezclan con un agitador magnético a 20-25°C durante 18-24 horas. Las células fijadas en cada muestra se lavan después independientemente cuatro veces en solución salina y a continuación se reajustan a un hematócrito del 8 % en el tampón de citrato al 5 % antes descrito.

EJEMPLO 2

20 Los volúmenes indicados en cada una de las muestras A a H obtenidas en el Ejemplo 1 se tratan con el aldehído indicado a continuación, en las cantidades señaladas.



Muestra	Volumen de suspensión celular tratada	Tampón de la suspensión de glóbulos rojos tratados	Aldehído	Volumen	Tampón del aldehído	Aldehído, %	Peso del aldehído presente
AG*	10 ml	cittrato	formaldehído ¹	10 ml	cittrato	1,1 %	0,11 g
BG	10 ml	cittrato	formaldehído	10 ml	cittrato	5,4 %	0,54 g
CG	10 ml	cittrato	glioxal ²	10 ml	cittrato	1,0 %	0,1 g
DG	10 ml	cittrato	glioxal	10 ml	cittrato	5,0 %	0,5 g
EG	1,15 ml	cittrato	formaldehído	1,15 ml	cittrato	3,2 %	0,037 g
FG	6,3 ml	cittrato	formaldehído	6,3 ml	cittrato	3,2 %	0,2 g
GG	10 ml	cittrato	formaldehído	10 ml	cittrato	3,2 %	0,32 g
HG	10 ml	cittrato	formaldehído	10 ml	cittrato	3,2 %	0,32 g

* En todos los casos, G significa tratado con glioxal

1 Solución de formaldehído al 40 % en peso/volumen, diluída al porcentaje indicado de aldehído con tampón de citrato.

2 Solución de glioxal al 40 % en peso/volumen, diluída al porcentaje indicado de aldehído con tampón de citrato.

	<u>Muestra</u>	<u>Volumen de suspen- sión celular tratada</u>	<u>Tampón de la suspen- sión de glóbulos ro- jos tratados</u>	<u>Aldehido</u>	<u>Volumen</u>
1	A _G *	10 ml	citrato	formaldehido ¹	10 ml
	B _G	10 ml	citrato	formaldehido	10 ml
5	C _G	10 ml	citrato	glioxal ²	10 ml
	D _G	10 ml	citrato	glioxal	10 ml
	E _G	1,15 ml	citrato	formaldehido	1,15 ml
	F _G	6,3 ml	citrato	formaldehido	6,3 ml
	G _G	10 ml	citrato	formaldehido	10 ml
10	H _G	10 ml	citrato	formaldehido	10 ml

* En todos los casos, G significa tratado con glioxal

1 Solución de formaldehido al 40 % en peso/volumen, diluída al porcenta-
trato.

2 Solución de glioxal al 40 % en peso/volumen, diluída al porcentaje in

20

25

30

<u>Tampón de la suspen</u> <u>ión de glóbulos ro</u> <u>s tratados</u>	<u>Aldehído</u>	<u>Volumen</u>	<u>Tampón del</u> <u>aldehído</u>	<u>Aldehído,</u> <u>%</u>	<u>Peso del alde</u> <u>hído presente</u>
citrato	formaldehído ¹	10 ml	citrato	1,1 %	0,11 g
citrato	formaldehído	10 ml	citrato	5,4 %	0,54 g
citrato	glioxal ²	10 ml	citrato	1,0 %	0,1 g
citrato	glioxal	10 ml	citrato	5,0 %	0,5 g
citrato	formaldehído	1,15 ml	citrato	3,2 %	0,037 g
citrato	formaldehído	6,3 ml	citrato	3,2 %	0,2 g
citrato	formaldehído	10 ml	citrato	3,2 %	0,32 g
citrato	formaldehído	10 ml	citrato	3,2 %	0,32 g

tratado con glioxal

% en peso/volumen, diluída al porcentaje indicado de aldehído con tampón de ci-

trato. peso/volumen, diluída al porcentaje indicado de aldehído con tampón de citrato.

1 Las células se mezclan con el aldehído a la temperatura ambiente durante 18-24 horas. Después se lavan cuatro veces con solución salina y se ajustan a un valor hematócrito del 8 % en tampón de fosfato 0,1M con la siguiente composición:

5
3,26 g de KH_2PO_4 anhidro
10,78 g de Na_2HPO_4 anhidro
1 g de NaN_3
c.s hasta 1 litro.

10 Las células se dejan en reposo a +5°C durante una semana y después se determina la hemólisis. El líquido que sobrenada de las muestras F, G y H es amarillo, indicando que las células no han sido totalmente estabilizadas.

EJEMPLO 3

15 Todas las muestras A a H obtenidas en el Ejemplo 2 se utilizan en un sistema de detección de antígeno-anticuerpo como sigue:

20 En un tubo de ensayo se dispensan 125 μl de la suspensión de células de hematrocrito 8 % en el tampón de fosfato 0,1M. Las células se lavan una vez con solución salina isotónica, se decanta la solución salina y se añaden a las células 0,5 ml de tampón de acetato¹ 0,1M, pH 4. A esta mezcla se añaden 5-20 microgramos de anticuerpo B_s de la hepatitis, purificado por afinidad, procedente de un chimpancé y la suspensión se mezcla a la temperatura ambiente durante 25 75 minutos. Después las células se lavan cuatro veces con la solución salina isotónica, se decanta la solución salina y

30
1
2,45 g de $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
4,7 ml de ácido acético (glacial)
c.s. hasta 1000 ml con agua destilada

1 las células se suspenden en el tampón de fosfato 0,1M des-
crito en el Ejemplo 2, que contiene adicionalmente EDTA
0,01M, 1 % de suero humano normal y 0,1 % de gelatina. Des-
pués se introduce una muestra de 25 ^μl de cada suspensión ce-
5 lular en un pozo de microvaloración que contiene 25 ^μl de
un diluyente y 7 ^μl de uno cualquiera de los siguientes in-
gredientes:

a) suero humano que se sabe que contiene antígeno B
de la hepatitis (débilmente positivo por la técnica de radio-
10 inmunoanálisis);

b) suero humano del que se sabe que da reacción nega-
tiva del antígeno B de la hepatitis por las técnicas de ra-
dioinmunoanálisis;

c) nada además del diluyente (pozo de control).

15 En todos los casos, las células recubiertas de anti-
cuerpo se mezclan sacudiéndolas y se dejan en reposo duran-
te 2 horas a la temperatura ambiente. Después los pozos se
examinan para determinar la presencia de una reacción de
aglutinación. Los Ejemplos A a D dieron reacciones para el
20 suero positivo y ninguna reacción con los negativos. El con-
trol no dió ninguna reacción.

Se preparó la Muestra E utilizando 0,6 g de glioxal/
0,8 ml de volumen celular compacto y dió reacciones no espe-
cíficas con los negativos.

25 Se encontró que las Muestras F a H no reaccionan espe-
cíficamente, indicando que son inadecuados para uso en un sis-
tema de detección del antígeno B_s de la hepatitis.

Resumiendo los ejemplos anteriores, a continuación se
indican las cantidades de glioxal y formaldehído o glioxal
30 sobre las células tratadas, donde Gx representa glioxal, F es

1 formaldehído y los números que preceden a cada símbolo significan las décimas de gramo por cada 0,8 ml de volumen celular compacto.

- 5
- A 4 Gx 1 F - reacción específica
 - B 4 Gx 5 F - reacción específica
 - C 4 Gx 1 Gx - reacción específica
 - D 4 Gx 5 Gx - reacción específica
 - E 6 Gx 3 F - reacción no específica
 - F 1 Gx 3 F - reacción no específica
 - 10 G 3 Gx 3 F - reacción no específica
 - H 5 Gx 3 F - reacción no específica.

EJEMPLO 4

15 Se repite el Ejemplo 1 para producir glóbulos rojos adecuadamente tratados, utilizando las siguientes cantidades de material en la primera etapa del tratamiento.

Tratamiento con glioxal en tampón de citrato - glóbulos rojos en citrato

<u>Muestra</u>	<u>Aldehído, %</u>	<u>Aldehído, g</u>
20 1	1 (glioxal)	0,1
2	1 (glioxal)	0,1
3	1 (glioxal)	0,1
4	1 (glioxal)	0,1
5	5 (glioxal)	0,5
25 6	5 (glioxal)	0,5
7	5 (glioxal)	0,5
8	5 (glioxal)	0,5
9	3 (glioxal)	0,3
10	3 (glioxal)	0,3
30 11	3,2 (formaldehído)	0,32
12	3,2 (formaldehído)	0,32

1 La segunda fase de fijación se realizó siguiendo el procedimiento del Ejemplo 2, utilizando el aldehído indicado a continuación:

5	<u>Muestra</u>	<u>Aldehído, %</u>	<u>G de aldehído/0,8 ml de volumen celular compacto</u>
	1 = 1 Gx	1,1 F	0,11
	2 = 1 Gx	5,4 F	0,54
	3 = 1 Gx	1 Gx	0,1
	4 = 1 Gx	5 Gx	0,5
10	5 = 5 Gx	1,1 F	0,11
	6 = 5 Gx	5,4 F	0,54
	7 = 5 Gx	1 Gx	0,1
	8 = 5 Gx	5 Gx	0,5
	9 = 3 Gx	3 Gx	0,3
15	10 = 3 Gx	3,2 F	0,32
	11 = 3,2 F	3,2 F	0,32
	12 = 3,2 F	3 Gx	0,3

20 Las Muestras 1-4, 9 y 10 presentan reacciones específicas para el HB_sAg siguiendo el procedimiento indicado en el Ejemplo 3 y no dan ninguna reacción con los controles y con los negativos conocidos.

Las Muestras 5-8 dan reacciones no específicas para el HB_sAg en las muestras negativas.

25 Las Muestras 11 y 12 no dan ninguna reacción específica para el HB_sAg positivo y por lo tanto son inadecuadas.

En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

30 1. Un método para la preparación de eritrocitos estabilizados, útiles en los sistemas de detección de antígenos

ME

1 nos-anticuerpos, caracterizado porque comprende:

- 5 a) hacer reaccionar una solución de eritrocitos en un medio acuoso con la cantidad adecuada de una solución de glioxal o formaldehído en un medio acuoso para suministrar 0,1 a 0,4 gr. de glioxal por cada 0,8 ml de volumen celular compacto de dichos eritrocitos, para obtener eritrocitos tratados;
- 10 b) opcionalmente, separar los eritrocitos tratados, procedentes de la etapa anterior, de la suspensión;
- c) opcionalmente, lavar las células separadas;
- d) formar una segunda suspensión de los eritrocitos en un medio acuoso; y
- 15 e) hacer reaccionar la suspensión procedente de la etapa anterior con la cantidad adecuada de una solución de glioxal o formaldehído en un medio acuoso para suministrar un mínimo de 0,1 grs. de glioxal o formaldehído por cada 0,8 ml. de volumen celular compacto de dichos eritrocitos tratados, con la condición de que, cuando en la etapa a) se ha utilizado formaldehído, en la etapa e) debe utilizarse necesariamente glioxal.
- 20

2. Un método según la Reivindicación 1, donde el medio de reacción acuoso de las etapas a) y e) tiene un grado de tonicidad esencialmente compatible con dichos eritrocitos.

25 3. Un método según la Reivindicación 2, donde el medio acuoso de las etapas a) y e) está constituido por una solución hipertónica de citrato sódico.

30 4. Un método según la Reivindicación 3, donde la etapa a) del tratamiento se realiza durante 18-24 horas a temperaturas de 18 a 25°C.

ME

1 5. Un método según la Reivindicación 4, donde
la etapa e) se realiza durante 18-24 horas a temperaturas
de 18-25°C.

5 6. Un método según la Reivindicación 3, donde
los eritrocitos se tratan en la Etapa a) con una solución
acuosa que contiene formaldehído o glioxal.

7. Un método según la Reivindicación 3, donde
los eritrocitos se tratan en la Etapa e) con 0,1 a 0,6 g
de formaldehído o glioxal.

10 8. Un método según la Reivindicación 7, donde
los eritrocitos tratados procedentes de la etapa a) se se-
paran del medio acuoso y se lavan antes de ser tratados en
las etapas d) y e).

15 9. Un método según la reivindicación 1, donde
los medios acuosos empleados en las diferentes etapas con-
tienen de 4,5 a 5% en peso/ volumen de citrato sódico, los
eritrocitos son eritrocitos humanos y, después de haber si-
do tratados según la etapa a), se separan de la suspensión
y la cantidad de glioxal o de formaldehído suministrada
20 por la solución de la etapa e) está comprendida entre 0,1
y 0,6 grs. por cada 0,8 ml. de volumen celular compacto de
los eritrocitos tratados.

10. Un método según la Reivindicación 1, donde
las etapas a) y e) se realizan a 18-25°C.

25 11. Un método según la Reivindicación 1, donde
las etapas a) y e) se realizan durante 18-24 horas.

12. Se reivindica por último como objeto sobre
el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
UN METODO PARA LA PREPARACION DE ERITROCITOS ESTABILIZADOS.

McE

1

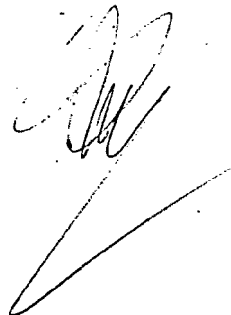
Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de veintidos páginas mecanografiadas.

5

Madrid, 16 marzo 1.977

BERNARDO UNGRIA

P.p.



10

15

20

25

30

m/e