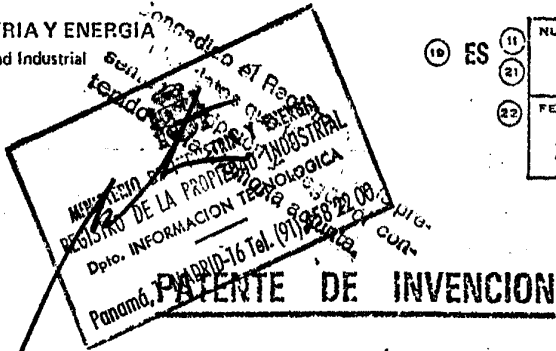




ESPAÑA



ES

11
21

NUMERO

478.800

A1

22

FECHA DE PRESENTACION

20 marzo 1.979

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
888.051	20.3.1978	Estados Unidos
3,827	16.1.1979	Estados Unidos

47 FECHA DE PUBLICIDAD	61 CLASIFICACION INTERNACIONAL	69 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G01N 33/16	

54 TITULO DE LA INVENCION

UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN REACTIVO INMUNOLOGICO ESTABLE.

71 SOLICITANTE (S)

ABBOTT LABORATORIES

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

14th Street and Sheridan Road - North Chicago, Illinois - EE.UU.

72 INVENTOR (ES)

Richard Henry Decker, de nacionalidad estadounidense.

73 TITULAR (ES)

El mismo solicitante.

74 REPRESENTANTE

DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU.

1 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a una mejora en los métodos de ensayos inmunológicos en fase sólida para la detección y determinación de antígenos y anticuerpos, especialmente los relacionados con la hepatitis.

5

La hepatitis A se caracteriza normalmente por un corto periodo de incubación de dos a seis semanas, prodromos suaves y una enfermedad clínica relativamente suave. La enfermedad se transmite por lo general por alimentos o líquidos contaminados, pero se ha visto que también puede transmitirse por inoculación sistemática. La hepatitis A se llamaba antes "hepatitis infecciosa". En los Estados Unidos el número de casos recogidos de hepatitis virásica no-B, considerada generalmente como hepatitis A principalmente, es por encima de 50.000 y se estima que la incidencia real en EE.UU es superior a 1,2 millones.

10

15

Debido a que no ha habido un ensayo específico conveniente, para antígeno de hepatitis A (HAVAg) o su anticuerpo (antiHAV), el diagnóstico se ha basado en los síntomas clínicos, asociación con un punto o fuente de erupción, historia del paciente, ensayos de funcionamiento del hígado y la ausencia de indicaciones de infección de hepatitis B.

20

Dos descubrimientos recientes han impulsado el desarrollo de ensayos específicos para contracción o exposición a la enfermedad: Los grandes esfuerzos en la identificación de modelos animales para estudiar la hepatitis A culminados en el hallazgo, en 1.973, de que los titis, y más tarde los chimpancés, son susceptibles a infección por virus de hepatitis A (HAV); y el descubrimiento de una partícula semejante a un virus de 27 nm de diámetro asociada con la

25

30

1 hepatitis A, por Feinstone y otros, en 1.973. Empleando la
técnica del microscopio electrónico inmune (IEM), Feinstone
y otros observaron estas partículas en extractos de heces de
5 pacientes con hepatitis A en fase aguda y demostraron que es-
taban agregadas por los sueros de convalecencia pero no por
los sueros de pre-infección de los mismos pacientes. Idénti-
cas partículas HAV se identificaron a continuación en el sue-
ro del hígado de primates infectados.

10 A estas primeras técnicas elaboradas biológi-
camente y con IEM siguieron pronto métodos inmunológicos más
prácticos para detección de HAAg y anti-HAV. Provost y otros
han descrito un ensayo de fijación complementario y han de-
mostrado su eficacia para detección de anti-HAV; Miller y
15 otros y Moritzugu han descrito los ensayos de adherencia in-
mune sensible (IAHA), también aplicable principalmente a de-
tección de anti-HAV. Hollinger y otros y Purcell y otros des-
criben procedimientos de radio-inmunoensayos (RIA) con ele-
vada sensibilidad en la detección tanto de HAVAg como de an-
20 ti-HAV en muestras biológicas. Los ensayos IAHA y RIA para
anti-HAV han resultado ser los procedimientos más útiles
para aplicaciones de laboratorio. Dienstag y otros han hecho
estudios comparativos de IAHA y RIA y han encontrado que los
dos ensayos son comparables en cuanto a sensibilidad y espe-
25 cificidad. Otro estudio posterior corroboraba este hallazgo
pero se señalaba que RIA detecta otros anticuerpos precoces
específicos para anti-HAV además de los detectados por IAHA
(Bradley y otros, J. Clin. Microbiol. 5:521-530, 1.977).
Garrison y colaboradores, patente estadounidense 3.790.663
(1974) describen un reactivo para detectar antígenos emplea-
30 dos en un RIA en fase sólida. Su técnica consiste en recu-
brir un polimero organico con antisuero y secar al aire pa-

1 ra producir un reactivo estable en almacenamiento, con una atracción por los antígenos comparable a la de los antígenos recubiertos de antisuero recién preparados, sin secar.

5 La infección de hepatitis B se transmite generalmente por productos de la sangre o instrumentos contaminados tales como agujas, pero puede también transmitirse por contacto fecal-oral. Antes una infección de hepatitis B se asociaba con un periodo de incubación que variaba de seis semanas a seis meses. Recientemente, sin embargo, se tienen
10 datos de periodos de incubación de sólo dos semanas. La enfermedad puede ser suave o asintomática, pero si es sintomática las manifestaciones pueden ser especialmente severas. Los prodromos pueden incluir artralgias, artritis, sarpullidos, fiebre, anorexia, fatiga y pruritis con o sin ictericia.

15 Por lo menos dos sistemas claros antígeno-anticuerpo pueden asociarse con la hepatitis B: superficie (HB_sAg : anti- HB_s) y "núcleo" (HB_cAg : anti- HB_c). El antígeno de superficie de hepatitis B (HB_sAg) encontrado en la sangre en forma de esferas de 22nm y en forma de túbulas alargadas que
20 tienen 22nm de diámetro y de longitud variable se cree que representa la proteína de recubrimiento del virus de hepatitis B. Se considera a una partícula de 42 nm que contiene DNA y una DNA polimerasa como representante del virus infeccioso (partícula Dane). En detergentes, la partícula Dane se degrada a un núcleo denso en electrones de 26nm, --
25 HB_cAg . Este último se ha visto en núcleos de hepatocitos de pacientes con hepatitis de suero durante la etapa de infección aguda. Así, los pacientes con hepatitis virásica tipo B puede esperarse que produzcan anticuerpos para antígeno
30 de superficie de recubrimiento proteínico (anti- HB_s) y también para núcleo proteínico (anti- HB_c).

1 El anti-HB_c aparece 12-20 semanas después de la ex-
posición, frecuentemente acompañado de antigenemia (HB_sAg)
a nivel de disfunción de hígado y mucho tiempo antes de la
aparición de anti-HB_s. El anti-HB_c va generalmente asociado
5 a una prolongada circulación de HB_sAg lo que sugiere que el
anti-HB_c se produce como respuesta a una activa multiplica-
ción del virus.

HB_sAg, anti-HB_s, y anti-HB_c existen aisladamente
en el suero o pueden coexistir en combinación en una muestra
10 individual. Los tres son útiles para calibrar el curso de la
infección por virus B de hepatitis.

El diagnóstico de la hepatitis B ha incluido ade-
más diversos ensayos, tales como inmuno.difusión o difusión
en gel-agar, contra-electroforesis, fijación de complemento
15 hemoaglutinación y ensayo radio-inmunológico.

Debido a su sencillez y sensibilidad, el sistema
de diagnóstico preferido para detectar antígenos y anticuer-
pos de hepatitis A y B es el ensayo radio-inmunológico en fa-
se sólida (RIA). Este procedimiento permite una sencilla y
20 rápida separación de los inmunoreactivos enlazados o no en-
lazados utilizados en la mayoría de los ensayos de inmuniza-
ción. Una desventaja del RIA en fase sólida, sin embargo,
en la diagnosis comercial de hepatitis, ha sido la relativa
inestabilidad de inmunoreactivos de hepatitis cuando cubren
25 directa o indirectamente al material en fase sólida.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

La referencia de Garrison y otros está dirigida a
los anticuerpos unidos a un soporte sólido y útiles en la
detección de antígenos. La invención descrita se refiere a
30 un reactivo mejorado que comprende un inmunoabsorbente recu-
bierto de azúcar unido a un soporte sólido que es útil en

1 la detección de antígenos y anticuerpos, en primer lugar a
los relacionados con la hepatitis A y B. Las directrices de
Garrison y otros no comprenden los reactivos reivindicados
y, por supuesto, no sugieren la estabilidad de los reacti-
5 vos demostrada por los reactivos recubiertos de azúcar tal
como se demuestra en los ensayos señalados a continuación.

En un objeto de la presente invención proporcionar
un reactivo para la detección y determinación de inmuncreac-
tivos tales como anticuerpos y antígenos en ensayos de inmu-
10 nización. Es otro objeto de esta invención proporcionar un
reactivo mejorado útil en un inmuno-ensayo para el diagnós-
tico de hepatitis por descubrimiento de la preparación y em-
pleo de un reactivo en fase sólida que es estable en un pe-
riodo de meses antes que horas. La estabilidad en almacena-
15 miento de los reactivos descubiertos obviarán la necesidad
de utilizar una fase sólida recién preparada cubierta con un
inmuno-reactivo y con ello harán que el uso de un inmuno-en-
sayo en fase sólida sea práctico en las determinaciones clí-
nicas de rutina.

20 RESUMEN DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a un reactivo estable
en el almacenado, útil en inmuno-ensayos para detección y
determinación de antígenos y anticuerpos. Estos reactivos
consisten, idealmente, en un soporte sólido que ha sido re-
25 cubierto bien directa o indirectamente con un antígeno o an-
ticuerpo y estabilizado con un recubrimiento azucarado para
impartir una capacidad de almacenado.

Una aplicación indirecta de anticuerpo o antígeno
a un soporte supone por lo general un procedimiento en el
30 cual el soporte sólido se cubre previamente con antígeno o
anticuerpo para potenciar la adherencia del correspondiente

1 anticuerpo o antígeno. Por ejemplo, si el soporte sólido ha de ser últimamente recubierto con antígeno de hepatitis A el soporte puede cubrirse previamente con anticuerpo de hepatitis A.

5 En la unión, bien directa o indirecta, del antígeno o anticuerpo al soporte sólido, es deseable preservar la avidéz del anticuerpo o la antigenicidad del antígeno. El método descubierto proporciona la manera de mantener la avidéz y antigenicidad del inmunoabsorbente expuesto por la aplicación de un recubrimiento azucarado.

DESCRIPCION DEL ASPECTO PREFERIDO

10 Esta invención ha resuelto el problema de la estabilidad encontrado cuando se recubría con antígenos y anticuerpos directa o indirectamente un material en fase sólida. Se observaba que el anticuerpo o antígeno expuesto perdía su avidéz o antigenicidad en cuestión de horas y quedaba esencialmente inútil en el ensayo para detección de los correspondientes anticuerpos o antígenos. Una solución a este problema ha sido mantener el soporte sólido cubierto en estado mojado o húmedo manteniéndolo en una solución salina tamponada. Esto proporciona una forma adecuada de mantener la avidéz y antigenicidad, pero la inconveniencia y gasto del sostenimiento de este medio se comprenden fácilmente.

20 En un inmunoensayo para la detección de anticuerpos, un antígeno que tiene afinidad para los anticuerpos se fija en un soporte sólido fácilmente manejable. Si puede ser obtenido en un estado razonablemente puro para asegurar la concentración adecuada, los antígenos pueden fijarse directamente a la superficie del soporte sólido. Además, habrá algunos antígenos que se adhieran a la superficie del soporte sólido más fácilmente que otros. Los que demuestran menos afinidad para la superficie del soporte pue

1 den fijarse empleando un pre-recubrimiento de anticuerpo. En este caso el soporte sólido se recubre con anticuerpo en forma convencional y después se expone a una fuente de antígenos.

5 Generalmente, los antígenos se adhieren más fácilmente al anticuerpo fijado y el antígeno no necesita ser purificado antes de su exposición al recubrimiento de anticuerpo. La afinidad entre anticuerpo y antígeno asegura la retención selectiva de material antígeno, y los residuos que
10 acompañan al antígeno pueden eliminarse por lavado.

El material soporte en fase sólida contemplado por esta descripción puede incluir bolas, tubos, cavidades y varillas que pueden fabricarse de diversos materiales que incluyen vidrio, metal o plástico. El aspecto preferido de esta invención emplea una bola de poliestireno. Este material se consigue fácilmente, es fácil de cubrir con los inmunoabsorbentes y fácil de manejar. Es esencial recordar que
15 la invención se manifiesta en la estabilidad del inmunoabsorbente fijado al soporte sólido, no con el soporte sólido sólo.
20

Los inmunoabsorbentes contemplados dentro del marco de esta invención incluyen todos los anticuerpos y antígenos que exhiben propiedades inmunoreactivas. Los aspectos más preferidos de la presente invención caracterizan antígenos o anticuerpos que tienen una afinidad para los anticuerpos y antígenos de hepatitis A o B empleados como inmunoabsorbentes y fijados a una bola de poliestireno bien directamente o indirectamente según el método señalado abajo.
25

El recubrimiento de azúcar que entra dentro del marco de esta invención incluye mono-, di- y polisacá-
30

1 ridos. Aunque los ejemplos señalados despues demostrarán la
eficacia particular de la sacarosa, se han formulado y apli-
cado otros azúcares a los soportes recubiertos de antígeno
y se ha visto que también son eficaces en la conservación de
5 la avidéz y antigenicidad. Por ejemplo, se preparan las si-
guientes soluciones azucaradas:

TABLA I

xilita	10% en PBS	(solución sali
lactosa	10% en PBS	na tamponada
glucosa	10% en PBS	con fosfato)
manita	10% en PBS	
PBS		
sorbita	10% en PBS	
dextrano	10% en PBS	

10

15

Las bolas de poliestireno cubiertas previamen-
te con anticuerpo de hepatitis A y expuestas subsiguiente-
mente a una fuente de antígeno A se lavan trs veces en PBS.
Se sumerjen en las formulaciones de la Tabla I durante 30
minutos a la temperatura ambiente. Excepto unas pocas de las
20 bolas sumergidas en el PBS solamente, todas las bolas se sa-
can y dejan secar a la temperatura ambiente durante la no-
che. Por la mañana, se colocan en una incubadora a 37°C du-
rante 2 horas. El ensayo de antigenicidad se lleva a cabo
utilizando un anticuerpo marcado radiactivamente en tres con-
25 troles negativos y tres controles positivos para cada grupo.

25

La relación de cuenta media por minuto para
los controles negativos a los positivos dan una indicación
de la actividad antígeno que permanece en la bola. La si-
guiente tabla da estas relaciones indicando la eficacia re-
30 lativa de los recubrimientos de azúcar empleados.

30

TABLA II

1.	PBS húmedo	36,9
2.	glucosa	32,7
3.	lactosa	29,8
4.	sacarosa	28,5
5.	xilita	26,8
6.	dextrano	26,8
7.	sorbita	25,9
8.	manita	22,4
9.	PBS seco	7,9

Lo anterior indica que hay una variedad de azúcares que sirven para recubrir, proteger y preservar la actividad de un soporte sólido recubierto con antígeno.

Los siguientes ejemplos demuestran además la utilidad de la invención descrita.

Ejemplo I

Un antisuero que contiene anti-HAV se diluye 1:500 a 1:6000 con tampón Tris 0,01M a pH 9,5. A este diluyente se añade una bola de poliestireno de aproximadamente 0,7 cm de diámetro. Se deja que el proceso de recubrimiento tenga lugar a la temperatura ambiente durante aproximadamente dos horas. Se lavan después las bolas en el tampón Tris y se someten a extractos de hígado o fecales que son positivos para HAV-Ag y que se han diluido 1:5 a 1:100 con fosfato 0,01M con solución salina 0,3M para dar un tampón (PBS) a pH 7,5. El HAV-Ag puede inactivarse antes de usarlo con formalina y tratamiento térmico por los métodos convencionales. No es necesaria ninguna purificación del HAV-Ag que contiene extracto tras la clarificación científica. Se deja que las bolas lleguen a recubrirse con HAV-Ag el cual se une a las

1 bolas por el camino de pre-recubrimiento con anti-HAV. Este
 proceso de recubrimiento con HAV-Ag se deja que transcurra a
 la temperatura ambiente durante 24 horas. Se lavan entonces
5 las bolas en PBS en el cual las bolas son estables y se alma-
 cenan hasta su posterior uso. Para obtener bolas secas esta-
 bles, se recubren las bolas lavadas con PBS con una solución
 de sacarosa al 5% a la temperatura ambiente durante aproxi-
 madamente 30 minutos y despues se secan al aire.

10 Preparación de reactivo anticuerpo marcado con ^{125}I .

 Se prepara anticuerpo marcado con ^{125}I (anti-
 HAV) por un método convencional y se diluye en suero de ter-
 nera fetal al 50% que contiene PBS, suero humano normal al
 2% y Tween -20 al 0,2% y 0,005M, 45°C durante 24-48 horas.
15 Si se emplea a temperatura más alta, tal como 56°C, la incu-
 bación podría acortarse a 0,5-3 horas.

15 Procedimiento de ensayo

 Se prefiere suero o plasma recalcificado como
 muestra de ensayo para anticuerpo de hepatitis A (anti-HAV).

20 El ensayo para detección de anticuerpo para
 antígeno de hepatitis A se basa en el principio de unión
 competitiva de suero anti-HAV con anti-HAV marcado radiacti-
 vamente a antígeno de hepatitis A (HAV-Ag). En una placa de
 ensayo, se mezcla anti-HAV ^{125}I con el suero del paciente y
25 se añade entonces un reactivo en fase sólida estable sobre
 el que ha sido fijado HAV-Ag. Despues de incubar durante la
 noche a temperatura ambiente o durante 4 horas a 45°C y un
 lavado subsiguiente, se determina la velocidad de cuenta de
 la bola en un contador de radiación gamma y se registra.

30 Una velocidad de cuenta superior al valor de
 interrupción establecido es negativo para anticuerpo mien-

1 tras que una cuenta baja indicaría enlace competitivo entre
el anticuerpo añadido marcado radiactivamente y el anticuerpo
endógeno en el suero. La presencia de anti-HAV puede de-
5 terminarse por cálculo del tanto por ciento de neutraliza-
ción de la muestra del paciente comparada con los controles
de prueba. Las neutralizaciones por ciento superiores a un
valor de interrupción de 50% indican la presencia de anti-
cuerpo por la misma lógica que lo señalado antes.

Ejemplo II

10 Preparación de Reactivo en fase sólida estable

Se tratan preparaciones de partículas Dane de
diversos grados de pureza con 2-mercaptoetanol (0,30-0,75%)
y detergente no-iónico, tal como Triton X-100 ó Nonidet P-40
a una concentración de aproximadamente 1,0 a 2,5% a 37°C du-
15 rante una hora. El propósito de este tratamiento es separar
la capa de lipoproteínas y dejar libre el antígeno del nú-
cleo de las partículas Dane. Se prefieren las anteriores con-
diciones para el tratamiento, pero pueden variarse sin efec-
to adverso. Después del tratamiento, se diluye apropiadamen-
20 te la mezcla con solución tampón; por ejemplo, Tris 0,01M-
HCl, pH 7,1, en solución salina fisiológica que contiene
EDTA 0,001M. La solución se utiliza inmediatamente para recu-
brir la superficie sólida de objetos tales como bolas, tubos
o cavidades hechos de plástico o vidrio. Los núcleos Dane
25 (HB_cAg) preparados de esta manera son muy "pegajosos" y se
pegan fácilmente a superficies sólidas por absorción. Cuando
las preparaciones de partículas Dane son muy impuras y contie-
nen niveles elevados de proteínas extrañas, es necesario el
pre-recubrimiento de los objetos sólidos con anti-HB_c antes
30 de reaccionar con núcleos Dane, como anteriormente. Con las

1 presentes preparaciones, cuando las bolas de poliestireno se
incuban con solución de núcleos Dane durante 24 a 72 horas,
hay más núcleos Dane sobre bolas limpias que sobre bolas pre-
cubiertas con anti-HB_c especialmente cuando se utilizan muy
5 bajas concentraciones de núcleos Dane. Se ha descubierto que
en la solución de recubrimiento, la concentración de deter-
gente deberá ser muy baja (preferiblemente inferior a 0,005%)
si los núcleos Dane se recubren directamente sobre superfi-
cies sólidas.

10 Para estabilizar la bola resultante cubierta
con HB_cAg, se emplea una solución de sacarosa al 5-10%. La
bola HB_cAg se incuba en dicha solución de sacarosa durante
aproximadamente 20 minutos a la temperatura ambiente y des-
pues se seca al aire.

15 Preparación de un ejemplo de reactivo anticuerpo marcado con
¹²⁵I

Se prepara un anticuerpo de núcleo Dane marca-
do con ¹²⁵I (anti-HB_c) para HB_cAg por métodos convencionales
y se diluye en Tris 0,005M con tampón EDTA 0,04M pH 7,3, que
20 contiene suero de ternera fetal al 50% y plasma humano nor-
mal recalcificado al 2%, y Tween-20 al 4%.

Procedimiento de ensayo

Se prefiere como muestra suero o plasma recal-
cificado para ensayarse para anticuerpo de hepatitis B (anti-
25 HB_c). El ensayo para detección de anti-HB_c se basa sobre el
principio de la unión competitiva a las bolas recubiertas
con antígeno de núcleo de hepatitis B (HB_cAg) entre anti-HB_c
marcado radiactivamente con ¹²⁵I y anti-HB_c presente en la
muestra del paciente. En una placa de ensayo, se incuba la
30 muestra del paciente junto con anti-HB_c radio-marcado con

1 ^{125}I y una bola recubierta con HB_cAg durante aproximadamente
20 horas a la temperatura ambiente. Después de incubación y
lavado, se determina la velocidad de cuenta de la bola en un
5 detector de radiación gamma adecuado y se registra. Una velo-
cidad de cuenta superior al valor de interrupción establecido
es indicativa de la ausencia de anti- HB_c o presencia de nive-
les no detectables de anti- HB_c en la muestra mientras que una
velocidad más baja que el valor de interrupción establecido
es indicativa de la presencia de anti- HB_c en el suero.

10 El mismo procedimiento para la estabilización
de una fase sólida señalado arriba puede seguirse donde el
antígeno de superficie de la hepatitis B recubre directa o
indirectamente al material de la fase sólida y hay RIA para
anticuerpo o antígeno de superficie de hepatitis B. Los dos
15 procedimientos de los ejemplos dependen, en primer lugar, de
la pureza del antígeno para recubrir la fase sólida. Un an-
tígeno de pureza elevada puede recubrir directamente la bola
sin necesidad de pre-recubrimiento con anticuerpo a ese anti-
20 geno.

Ejemplo III

Antisuero de conejo de Indias que contiene
anti- HB_s se diluye 1:1750 en solución salina tamponada con
fosfato (PBS, fosfato de sodio 0,01M, cloruro de sodio 0,15 M,
25 pH 7,2). Esta solución se añade a un matraz que contiene bo-
las de poliestireno de diámetro 0,64 cm. Esta solución de re-
cubrimiento, que contiene las bolas, se calienta a 45°C por
inmersión en un baño de agua a 45°C durante 2 horas. Se la-
van entonces las bolas dos veces con PBS (el cual está a
temperatura ambiente). Se recubren entonces las bolas con
30 una solución de PBS que contiene 2% de sacarosa a la tempe-

1 ratura ambiente durante aproximadamente 15 minutos. Se secan entonces las bolas al aire.

5 Empleando este procedimiento, se recubren similarmente otras bolas con 2% de lactosa, 2% de glucosa y con PBS sólo por inmersión durante aproximadamente 15 minutos. Todas las bolas se secan al aire.

Ejemplo IV

10 Se lleva a cabo un ensayo radio inmunológico para detección de antígeno de superficie de hepatitis B empleando anticuerpo marcado radiactivamente en controles negativos, muestras que contienen antígeno HB_sAg/ad y muestras que contienen antígeno HB_sAg/ay. La relación de cuentas en las muestras que contienen antígeno a las muestras en el control negativo se da en la tabla siguiente para bolas de poliestireno recubiertas con diversos azúcares:

TABLA III

Azúcar utilizado en el recubrimiento de las bolas	Relación de bolas ad/control neg. almacenadas a		Relación de bolas ay/control neg. almacenadas a	
	4°C	3d-45°C	4°C	3d-45°C
20 Lactosa	36,3	36,1	30,4	30,1
Sacarosa	33,6	38,3	31,7	31,9
Glucosa	37,2	37,9	31,3	31,0
(PBS sólo) Sin azúcar	24,5	21,0	15,1	9,6
25 Sacarosa (en agua)	36,1	31,0	28,1	28,5

30 Los datos de la Tabla III indican que hay una diversidad de azúcares que sirven para cubrir, proteger, y conservar la actividad de un soporte sólido recubierto con anticuerpo. Los datos de la Tabla III muestran también que las bolas recubiertas con anticuerpo que carecen del azúcar

1 protector tienen una actividad reducida frente a los antígenos HB_sAg/ad y HB_sAg/ay después de someterse al calor, y la actividad frente a antígeno HB_sAg/ay se reduce incluso antes de someterse al calor.

5 Ejemplo V

Se lleva a cabo un ensayo inmunológico enzimático para detección de antígeno de superficie de hepatitis B utilizando un conjugado antígeno de superficie de anti-hepatitis B - peroxidasa. Las muestras consisten en controles negativos, muestras que contienen antígeno HB_sAg/ad y muestras que contienen antígeno HB_sAg/ay. La diferencia de la densidad óptica a 492 nm en las muestras que contienen antígeno menos la de las muestras de control negativo se da en la siguiente tabla para bolas de poliestireno recubiertas con diversos azúcares:

TABLA IV

Azúcar empleado en el recubrimiento de la bola	Bolas Ad menos control negativo almacenadas a		Bolas Ay menos control negativo almacenadas a	
	4º C	3d-45º C	4º C	3d-45º C
20 Lactosa	0,520	0,488	0,426	0,390
Sacarosa	0,486	0,527	0,401	0,396
Glucosa	0,479	0,503	0,413	0,365
(PBS sólo) Sin azúcar	0,339	0,257	0,217	0,121
25 Sacarosa (en agua)	0,513	0,420	0,496	0,374

Los datos de la Tabla IV muestran que hay diversidad de azúcares que pueden servir para recubrir, proteger y conservar la actividad de un soporte sólido recubierto de anticuerpo. Los datos de la Tabla IV también muestran que las bolas recubiertas de anticuerpo que carecen del recu

1 brimiento de azúcar protector tienen actividad reducida
frente a antígeno HB_sAg/ay antes y después de someter al
calor a las bolas.

5 En resumen, la Patente de Invención que se solici-
ta deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

10 1. Un procedimiento para la preparación de un reac-
tivo inmunológico estable útil en la realización de ensayos
inmunológicos, que comprende un inmunoadsorbente recubierto
de azúcar fijado a un soporte sólido, que opcionalmente es-
tá recubierto de otro inmunoadsorbente, cuyo procedimiento
comprende:

15 a) recubrir un soporte sólido, que opcionalmente se
ha recubierto previamente con un inmunoadsorbente, con un
inmunoadsorbente;

b) tratar el producto de la etapa anterior con una
solución de un azúcar, para recubrir el inmunoadsorbente de
dicho azúcar.

20 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, don-
de el inmunoadsorbente es un antígeno.

25 3. Un procedimiento según la reivindicación 2, don-
de el antígeno se selecciona del grupo que consiste en an-
tígeno de hepatitis A, antígeno de superficie de hepatitis
B, antígeno de núcleo de hepatitis B y antígeno de hepati-
tis e.

4. Un procedimiento según la reivindicación 1, don-
de el inmunoadsorbente es un anticuerpo.

30 5. Un procedimiento según la reivindicación 4, don-
de el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en an-

1 anticuerpo de hepatitis A, anticuerpo de superficie de hepatis
tis B, anticuerpo de núcleo de hepatitis B y anticuerpo de
hepatitis e.

5 6. Un procedimiento según la reivindicación 1, don-
de el reactivo obtenido comprende un antígeno recubierto de
azúcar fijado a un soporte sólido.

10 7. Un procedimiento según la reivindicación 1, don-
de el reactivo obtenido comprende un antígeno recubierto con
azúcar fijado sobre un soporte sólido recubierto con anticuer-
po.

8. Un procedimiento según la reivindicación 1, don-
de el reactivo obtenido comprende un anticuerpo recubierto
con azúcar fijado a un soporte sólido.

15 9. Un procedimiento según la reivindicación 1, don-
de el reactivo obtenido comprende un anticuerpo recubierto
con azúcar fijado a un soporte sólido cubierto con antígeno.

20 10. Un procedimiento según la reivindicación 1, don-
de el reactivo obtenido comprende un antígeno de hepatitis
recubierto con azúcar fijado a un soporte sólido de plásti-
co.

25 11. Un procedimiento según la reivindicación 1, don-
de el reactivo obtenido comprende un antígeno de hepatitis
A recubierto con azúcar fijado a un soporte sólido recubier-
to de anticuerpo de hepatitis A.

12. Un procedimiento según la reivindicación 11,
donde el soporte sólido es una bola de poliestireno.

30 13. Un procedimiento según la reivindicación 1, don-
de el reactivo obtenido comprende un anticuerpo de núcleo
de hepatitis B fijado a un soporte sólido.

1 14. Un procedimiento según la reivindicación 1,
donde el reactivo obtenido comprende un anticuerpo de super-
ficie de hepatitis B recubierto con azúcar fijado a un so-
porte sólido.

5 15. Se reivindica por último como objeto sobre el
que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN REACTIVO INMUNO-
LOGICO ESTABLE.

10 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente memoria descriptiva que consta de diecinueve pági-
nas mecanografiadas.

Madrid, 20 marzo 1.979

BERNARDO UNGRIA

D/P.



15

20

25

30