

440.173

11 AGO. 1975

Int. Cl. 2: H01M GOIN

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION

a nombre de SYVA COMPANY

entidad norteamericana

establecida en 3181 Porter Drive, Palo Alto, California
94304, Estados Unidos de América.

por: "UN METODO PARA DETERMINAR EN UNA SOLUCION DE ENSAYO
LA PRESENCIA DE UN LIGANDO"

Prioridades reivindicadas: Estados Unidos de América, el 12
de Agosto de 1974, nº 497.167 y 30 de Junio de 1975 nº
591.386.

P. 60.838

File Nº 3652 - 73N

Resumen de la descripción

Se proporcionan ensayos de inmunidad que emplean anticuerpos y un par cromóforo fluorescente-extinguidor (F-Q), en el que uno o ambos constituyentes del par cromóforo están unidos a anticuerpos. Dependiendo del ligando particular de interés, se pueden emplear diversas combinaciones de reactivos, en las que la cantidad de extinción está relacionada directamente con la cantidad de ligando presente en el medio de ensayo.

Al realizar el ensayo, el elemento desconocido y el anticuerpo específico para el ligando de interés al que está unido uno de los constituyentes del par F-Q, se combinan en un medio tamponado acuoso. Dependiendo de la receta o método, se emplean diferentes reactivos de ensayo en el medio tamponado acuoso: (1) análogo del ligando unido al otro constituyente del par F-Q; (2) anticuerpos específicos para el ligando al que está unido el otro constituyente del par F-Q o; finalmente, (3) una combinación de una pluralidad de ligandos unidos entre sí a través de grupos de enlace a una molécula central, generalmente un polímero, en combinación con el anticuerpo unido al otro

constituyente del par F-Q. La composición se irradia con luz de una longitud de onda absorbida por la molécula fluorescente y se determina la cantidad de fluorescencia. Empleando patrones apropiados, se puede determinar la presencia y la cantidad del ligando.

REFERENCIA CRUZADA A LAS SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud es continuación en parte de la solicitud de EE.UU. número de serie nº 497.167, presentada el 12 de agosto de 1974.

FUNDAMENTO DE LA INVENCION

Campo de la invención

Existe una continua necesidad de métodos sensibles y rápidos para determinar cantidades diminutas de compuestos orgánicos. Se han desarrollado con este fin varias técnicas. Entre las técnicas disponibles comercialmente están las de ensayo de inmunidad por radiación, las de ensayo de inmunidad marcado por el espín, para las cuales se venden reactivos bajo la marca FRAT^(R), las del ensayo de inmunidad por enzima homogénea, para las cuales se venden reactivos bajo la marca registrada EMIT^(R), y la hemoaglutinación (HI). Estas técnicas son eficaces para determinar cantidades de materiales comprendidas en el intervalo de 10^{-6} a 10^{-10} M o inferiores.

Estas técnicas implican todas ellas la aptitud de una molécula receptora, generalmente un anticuerpo, para poder reconocer una organización espacial y polar específica de una molécula. Excepto en lo que respecta a la hemoaglutinación, las técnicas dependen de disponer de un reactivo que pueda competir con la molécula que está siendo sometida a ensayo, por la molécula receptora. Siendo capaz de distinguir entre el reactivo que está unido a la molécula receptora y el reactivo que no está unido a ella, se puede determinar la cantidad del compuesto de interés que está presente.

Al desarrollar ensayos de inmunidad, se está limitado por la disponibilidad y propiedades de una molécula receptora apropiada. Sin embargo, en lo que respecta a los otros reactivos y a la técnica de medición, hay varias consideraciones diferentes que contribuyen a un ensayo más exacto, conveniente o comercialmente deseable. En primer lugar, es deseable que haya un número mínimo de mediciones de los diversos reactivos, así como de transferencias de los diversos reactivos. En segundo lugar, el equipo para la medición debe ser razonablemente económico, de tal modo que sea accesible a un amplio margen de usuarios. En tercer lugar, los reactivos empleados deben ser relativamente estables, de tal modo que sean susceptibles de almacenamiento y transporte.

En cuarto lugar, el método no debe estar sometido a una interferencia importante procedente de otros materiales que pueden estar presentes accidentalmente en la muestra que ha de ser ensayada. Otras consideraciones son la facilidad de adiestramiento de los técnicos, la ausencia de peligros para la salud, la sensibilidad, la reproducibilidad, y la posibilidad de aplicación a una amplia variedad de ligandos.

La presente invención se basa en el fenómeno de transferencia de energía entre dos cromóforos. Cuando un cromóforo fluorescente se irradia con luz que es absorbida por el cromóforo, el cromóforo fluorescente puede disipar la energía de la luz absorbida, emitiendo luz de una longitud de onda más larga, es decir, produciendo fluorescencia. Si otro cromóforo está a menos de 100 \AA del fluorescedor y absorbe la luz de la longitud de onda de emisión, existe una probabilidad, que depende de otros factores, de que el fluorescedor transfiera al otro cromóforo la energía que, de otro modo, habría emitido en forma de luz, produciendo, en realidad, una extinción del fluorescedor.

Descripción de la técnica anterior

La patente de Estados Unidos Nº 3.709.868 es ilustrativa de un ensayo de inmunidad por radiación. La

patente de Estados Unidos N° 3.690.834 es ilustrativa de un ensayo de inmunidad por espín. Las patentes de Estados Unidos N° 3.654.090 y 3.817.837 son ilustrativas de ensayos de inmunidad por enzimas. Los artículos de interés incluyen un artículo por Ludwig Brand y James R. Cohlke, titulado, Fluorescence Probes for Structure, Annual Review of Biochemistry, 41, 843-868 (1972); y el de Stryer, Science, 162, 526 (1968). También es de interés la solicitud de patente de EE.UU. en tramitación número de serie 402.693, presentada el 2 de octubre de 1973.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se proporciona un método para determinar la presencia o la cantidad de un compuesto orgánico, para el que se dispone de, o se puede preparar, un receptor o molécula receptora, generalmente un anticuerpo. Al compuesto orgánico se hará referencia en lo que sigue como el ligando.

Al realizar el ensayo, se emplean dos cromóforos que son un par fluorescedor-extinguidor. La cantidad de fluorescedor existente dentro de la distancia de extinción del extinguidor, está afectada por la cantidad de ligando presente en el medio de ensayo.

Se introduce un cromóforo en el medio de ensayo uni

do covalentemente a una composición receptora, la cual se une específicamente al ligando. El segundo cromóforo puede ser introducido en el medio de ensayo de diferentes maneras: (1) unido covalentemente a una composición receptora que es la misma o diferente de la composición receptora conjugada con el primer cromóforo, pero que en ambos casos se une específicamente al ligando, y en presencia o ausencia de poliligando; o unido covalentemente a un análogo del ligando, cuando el análogo del ligando puede competir con el ligando por la composición receptora. La elección de los modos de introducción dependerá, hasta un importante grado, del número de puntos epitópicos o hapténicos independientes presentes en el ligando.

Cuando el ligando tiene solamente un punto epitópico independiente (monoepitópico), generalmente un cromóforo será covalentemente unido a un receptor para el ligando, y el otro cromóforo será proporcionado como covalentemente unido a un análogo del ligando o a una combinación del poli(análogo del ligando) y el cromóforo covalentemente unido al receptor para el ligando.

Cuando el ligando tiene una pluralidad de puntos epitópicos independientes (poliepitópico), los modos indicados anteriormente pueden ser utilizados, además de los siguientes modos. En un modo, los dos cromóforos

son individualmente unidos al receptor para el ligando. En otro modo, el receptor para el ligando se obtiene de diferentes especies y un cromóforo se une al receptor para el ligando-receptor de una especie, y el otro cromóforo se une al receptor para el ligando-receptor de otra especie. Este último método amplía la versatilidad del ensayo objeto del invento, permitiendo reactivos comunes para una amplia variedad de ensayos, simplifica los procedimientos de purificación, y permite la determinación de la presencia de asociaciones, distinguiéndolas de las partes componentes.

Los diversos materiales se mezclan entre sí en un medio tamponado acuoso, se incuban y se irradian con luz absorbida por las moléculas fluorescentes. Determinando la cantidad de fluorescencia, después de incubación durante un intervalo de tiempo predeterminado o después de que el sistema se ha aproximado al equilibrio, y comparando los resultados obtenidos con uno o más patrones conocidos, se puede determinar la presencia o la cantidad del ligando.

DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES ESPECIFICAS

Definiciones.

Ligando: una molécula orgánica o asociación de éstas, normalmente mayor de un peso molecular de 100 y que

tiene por lo menos un grupo funcional, normalmente polar, para el que se dispone de modo natural de, o se puede preparar, un receptor.

Análogo del ligando: un radical monovalente o polivalente, del cual una proporción substancial tiene la misma organización espacial y polar que el ligando, para definir uno o más puntos epitópicos o determinantes capaces de competir con el ligando por los puntos de unión de un receptor, y difiere del ligando en la falta de un átomo o de un grupo funcional en el punto de unión con otra molécula, o en que tiene un grupo de enlace que ha sido introducido en lugar de uno o más átomos originalmente presentes en el ligando. El precursor del análogo del ligando es el compuesto empleado para conjugar el ligando o el análogo del ligando con otra molécula, por ejemplo, con el cromóforo.

Asociación: Una combinación de moléculas orgánicas unidas entre sí por enlaces distintos de los covalentes, que tienen, generalmente, pesos moleculares que exceden de 600, generalmente que exceden de 1000 y que pueden ser de 1.000.000 ó más, para la cual se dispone de un receptor de origen natural o se puede preparar; una asociación ilustrativa es un antígeno y un anticuerpo o, una molécula preparada a partir de dos entidades discontinuas, normalmente unidas entre sí por enlaces débiles,

tales como enlaces polares o enlaces de disulfuro, los cuales, en las condiciones del sistema, son capaces de estar en equilibrio con las entidades individuales.

Cromóforo: Una molécula fluorescente o extinguidora; en la presente invención, el fluorescente y el extinguidor están interrelacionados. La molécula fluorescente es un cromóforo que es capaz de absorber luz de una longitud de onda y emitir luz de una longitud de onda más larga. La molécula extinguidora es capaz de inhibir la fluorescencia cuando se encuentra a una distancia corta, generalmente inferior a aproximadamente 100 \AA , de la molécula fluorescente, aceptando la energía que, de otro modo, emitiría como luz fluorescente. Por lo que respecta a la molécula o composición a la que están unidos los cromóforos, en la mayor parte de los casos, el fluorescente y el extinguidor serán intercambiables, aunque con frecuencia habrá alguna preferencia. Por lo tanto, con fines de generalización, se hará referencia a las dos moléculas como cromóforo e, individualmente, se hará referencia a ellas como Ch_1 y Ch_2 .

Análogo del ligando-cromóforo (análogo del ligando- $-(Ch_2)_x$): el análogo del ligando está unido, covalentemente a una o más moléculas fluorescentes o moléculas de extinguidor. Con ligandos pequeños, los que tienen un peso molecular inferior a 10.000 aproximadamente, gene-

ralmente un peso molecular inferior a 2.000 aproximadamente, el análogo del ligando se unirá, generalmente, a menos de 10 cromóforos, generalmente a de 1 a 10 cromóforos, y a no más de aproximadamente un cromóforo por cada 1.000 unidades de peso molecular. Con un ligando grande, de un peso molecular de por lo menos 2.000, generalmente de un peso molecular de por lo menos aproximadamente 10.000, una pluralidad de cromóforos pueden ser unidos covalentemente a un análogo del ligando. El número de cromóforos presentes estará limitado por el número que pueda ser introducido sin enmascarar demasiados puntos epitópicos del ligando y por el deseo de disponer de un número suficiente de cromóforos para asegurar una cantidad substancial de extinción cuando el receptor- Ch_1 está unido al análogo del ligando- $(\text{Ch}_2)_x$.

Poli(análogo del ligando)-poli(cromóforo) [poli(análogo del ligando)-poli(Ch_2)]: análogo del ligando y cromóforo están unidos a una molécula núcleo o central, de múltiples grupos funcionales, soluble en agua, de alto peso molecular (en comparación con el análogo del ligando y con el cromóforo), para proporcionar una pluralidad de grupos de análogo del ligando y de grupos cromóforos espaciados sobre la superficie de la molécula, de tal modo que cuando el receptor- Ch_1 está unido al análogo del ligando, algunos grupos Ch_1 estarán presentes:

dentro de la distancia de extinción de los grupos Ch_2 .

Poli(análogo del ligando) : los grupos de análogos del ligando están unidos a una molécula núcleo o central, de múltiples grupos funcionales, soluble en agua, de alto peso molecular (en comparación con el análogo del ligando), de tal modo que haya un número suficiente de análogos del ligando por superficie unidad, para que tenga lugar la extinción cuando el poli(análogo del ligando) está saturado con el receptor $-\text{Ch}_1$ y el receptor $-\text{Ch}_2$ en proporciones apropiadas.

Receptor-cromóforo (receptor- Ch_1 y receptor- Ch_2): un receptor es una molécula que es capaz de distinguir un punto epitópico y de unirse a dicho punto. Generalmente, los receptores tendrán constantes de unión o enlace en exceso de 10^4 , frecuentemente, en exceso de 10^6 . En su mayor parte, los receptores son anticuerpos, aunque pueden actuar también como receptores, enzimas, ácidos nucleicos y ciertas globulinas. En la presente invención, los receptores serán, en su mayor parte, anticuerpos a los que estarán unidos uno o más grupos cromóforos, generalmente por lo menos dos o más.

Composición receptora: La composición receptora es una composición homogénea o heterogénea, capaz de unirse mediante enlace no covalente, específicamente, al ligando y al análogo del ligando, e incluye una composición

que reconoce específicamente el ligando (antiligando) y una combinación de antiligando y de una composición que reconoce específicamente el antiligando (anti(antiligando)).

Memoria general de la invención.

El método se basa en el empleo de dos cromóforos que forman un par fluorescedor-extinguidor. Por tener una composición (receptor) que específicamente reconoce o se une a un ligando al que uno de los cromóforos está unido covalentemente, y por tener el segundo cromóforo unido al análogo del ligando o receptor, la cantidad de ligando presente en la solución de ensayo afectará a la cantidad de extinguidor existente dentro de la distancia de extinción del fluorescedor. El ensayo podrá ser realizado competitivamente, cuando el análogo del ligando compite con el ligando por el receptor, estando presente el análogo del ligando como poli(análogo del ligando) o unido covalentemente al cromóforo. El ensayo puede ser realizado también de manera no competitiva, con ligandos que tienen una pluralidad de puntos epitópicos, cuando el receptor que tiene cada uno de los cromóforos se une al ligando.

Composiciones.

Dependiendo del método particular empleado y del

ligando de interés, se emplearán en el medio de ensayo una o más de las siguientes composiciones de reactivo: Análogo de ligando-cromóforo, poli(análogo del ligando)-poli(cromóforo, poli(análogo del ligando), uno o dos receptores y uno o dos receptor-cromóforos. La primera composición a considerar será el análogo del ligando-cromóforo.

Análogo del ligando-cromóforo y poli(análogo del ligando)-poli(cromóforo).

El análogo del ligando-cromóforo puede ser subdividido en dos grupos. El primer grupo es cuando el análogo del ligando-cromóforo tiene un solo análogo del ligando y un sólo cromóforo unidos entre sí mediante un grupo de enlace relativamente corto. En estos casos, el análogo del ligando será en su mayor parte hapténico, en lugar de antigénico y, generalmente, tendrá un peso molecular inferior a aproximadamente 10.000, más generalmente un peso molecular inferior a aproximadamente 6.000 y frecuentemente, un peso molecular comprendido en el margen de aproximadamente 125 a 1000, excluyendo el grupo de enlace empleado para la unión al cromóforo. En su mayor parte, el análogo del ligando diferirá del ligando en que tiene un grupo funcional particular reemplazado por un enlace, un hidrógeno reemplazado por un enlace, o una cadena de carbono corta reemplazada por un enlace

(por enlace se pretende incluir enlaces múltiples, así como enlaces sencillos) para unirse al grupo de enlace para la unión al cromóforo. Seguidamente se expondrán los diversos ligandos hapténicos o de bajo peso molecular.

El grupo de enlace no tendrá, normalmente, más de aproximadamente 10 átomos en la cadena entre el ligando y el cromóforo, teniendo más generalmente, bien sea un enlace o de aproximadamente 1 a 6 átomos en la cadena. Los átomos serán, en su mayor parte, carbono, oxigeno, nitrógeno y azufre, particularmente carbono, oxigeno y nitrógeno.

Los grupos funcionales implicados en el grupo de enlace serán, normalmente, carbonilos no oxo (incluyendo imino y tionocarbonilo), oxi, amino (particularmente amino terciario o cuaternario) o combinaciones de los mismos, por ejemplo, amido, carbamilo y amidino.

Los dos cromóforos, bien sea el fluorescedor o el extinguidor, tendrán normalmente, una función amino o alcohol para reaccionar con una función carbonilo no oxo (incluyendo sus análogos de nitrógeno y azufre) o tendrá una función carbonilo no oxo, que se puede hacer reaccionar con una función amina o alcohol.

Cuando el ligando sea de un peso molecular de por lo menos 2000, podrán estar unidos al ligando una plura

lidad de grupos cromóforos. Generalmente, habrá por lo menos un grupo cromóforo por cada 20.000 unidades de peso molecular, más generalmente por lo menos un grupo cromóforo por cada 10.000 unidades de peso molecular, y no más de un grupo cromóforo por cada 1.000 unidades de peso molecular, más generalmente no más de un grupo cromóforo por cada 2.000 unidades de peso molecular. Las consideraciones concernientes al número de cromóforos conjugados con el ligando han sido previamente numeradas. Los grupos de enlace serán como se han descrito anteriormente. Generalmente el ligando será un polipéptido o proteína antigénicos, que tengan una pluralidad de grupos amino. Se puede utilizar un halógeno activo o un carbonilo no oxo (incluyendo los análogos de nitrógeno y de azufre), para la conjugación para formar un enlace covalente o amidas, amidinas, tionoamidas, ureas, guanidinas y tioureas.

Alternativamente, el ligando y el cromóforo (Ch_1 o Ch_2) pueden estar unidos a una molécula central (poli(análogo del ligando)-poli(cromóforo)). La molécula central o molécula núcleo puede ser empleada con ventaja por una diversidad de razones. La molécula núcleo será, generalmente, una molécula polímera de un peso molecular relativamente alto, normalmente de un peso molecular en exceso de 20.000, frecuentemente de un peso molecular de 60.000,

y puede ser de 10 millones o superior. La molécula núcleo será, normalmente, soluble en agua o dispersable en un medio acuoso, para proporcionar una dispersión estable, en la que el material dispersable no interfiere con la absorción o irradiación de luz. La molécula núcleo puede ser un material natural, natural modificado, o sintético. Se incluyen entre las moléculas núcleo los polipéptidos, proteínas, polisacáridos, polímeros sintéticos, y similares. La naturaleza de la molécula central puede variar ampliamente, en tanto ésta tenga un suficiente número de funciones para permitir la introducción de las moléculas de ligando y de cromóforo.

Entre las proteínas que pueden encontrar uso están las albúminas, globulinas, proteopolisacáridos y similares; entre los polisacáridos están la amilosa, celulosa, agarosa, dextranos o similares, bien sea tal como se obtienen o parcialmente degradados; entre los polímeros sintéticos se pueden emplear el poli(alcohol vinílico), los acrilatos, los copolímeros de los mismos, o similares.

Normalmente, no habrá menos de aproximadamente una molécula de conjugado (análogo del ligando o cromóforo) por cada 50.000 unidades de peso molecular, más generalmente no menos de aproximadamente una molécula de conjugado por cada 25.000 unidades de peso molecular y gene-

ralmente, no más de aproximadamente una molécula de conjugado por cada 1.000 unidades de peso molecular, más generalmente no más de aproximadamente una molécula de conjugado por cada 2.000 unidades de peso molecular.

La proporción de moléculas de cromóforo a ligando estará, generalmente, comprendida entre aproximadamente 0,05 - 20 : 1, más generalmente entre aproximadamente 0,5 - 20:1, preferiblemente entre aproximadamente 1-10:1 y, más preferiblemente, entre aproximadamente 2-8:1.

Cuando el cromóforo es la molécula de fluorescedor para los fines de esta invención, habrá generalmente por lo menos de aproximadamente 0,5 a 20, más generalmente desde aproximadamente 1 a 10 y, preferiblemente, desde aproximadamente 2 a 7 moléculas fluorescentes por molécula de ligando. Cuando el cromóforo es la molécula extinguidora, el número de moléculas extinguidoras por ligando será, generalmente, de entre aproximadamente 0,5 a 20, más generalmente de entre aproximadamente 1 a 20 y, preferiblemente, de entre 2 a 15 por cada molécula de ligando.

Los conjugados para la molécula central tendrán el mismo tipo de grupo de enlace que el que se empleó para unir el cromóforo con el ligando. La elección particular de las funciones dependerá de los grupos funcionales de que se disponga sobre la molécula núcleo.

Receptor-cromóforo.

Como en la mayor parte de los casos, el receptor es un anticuerpo, la presente descripción se referirá al anticuerpo como ilustrativo del receptor. Los anticuerpos tienen varios grupos amino activos que pueden ser utilizados para la conjugación covalente del cromóforo con el anticuerpo. Convenientemente, el cromóforo puede tener una función carbonilo no oxo (incluyendo sus análogos de nitrógeno y de azufre) o una función alfa-halógeno carb^onilo activa. Las funciones ilustrativas para enlazar el cromóforo con el anticuerpo incluyen los halogenuros de acilo, anhídridos mixtos, ésteres de imidato de alcoholilo, isotiocianato, cloroacetilo, bromoacetilo o yodoacetilo, y similares.

Las condiciones para la conjugación emplean temperaturas moderadas de 0 a 40°C, en medios acuosos a pH moderados. La conjugación de los cromóforos con las proteínas es conocida en la técnica. The y otros, *Immunology*, 18, 865 (1970) Cebra y otros, *J. Immunol.*, 95, 230 (1965); Goldman, *Fluorescent Antibody Methods*, Academic Press, New York (1968).

El número de grupos cromóforos que se conjugan con el anticuerpo pueden variar a lo largo de un margen relativamente amplio, dependiendo del cromóforo de que se trate. Habrá por lo menos un grupo cromóforo por cada

anticuerpo y, generalmente, como promedio, desde aproximadamente 2 a 30, más generalmente desde aproximadamente 3 a 25 grupos cromóforo por anticuerpo. Cuando el cromóforo es el fluoroscador, el número medio de grupos cromóforo por anticuerpo será de aproximadamente 1 a 20, generalmente de 2 a 15 y, más generalmente, de 2 a 10. Cuando el cromóforo es el extinguidor, el número medio de grupos cromóforos por anticuerpo será de aproximadamente 2 a 30, generalmente de 3 a 25 y, más generalmente, de 5 a 25.

También debe advertirse que cuando se preparan anticuerpos para un ligando que tiene una pluralidad de puntos epitópicos, la composición receptora no es homogénea. Es decir, que el receptor tendrá anticuerpos que reconocen diferentes puntos epitópicos. Con referencia al receptor, se pretende incluir todos los anticuerpos que sean capaces de unirse específicamente a cualquiera de los puntos epitópicos del ligando.

Poli(análogo del ligando).

El poli(análogo del ligando) difiere del análogo del ligando-cromóforo y del poli(análogo del ligando)-poli(cromóforo) en que no hay ningún cromóforo presente, solamente el análogo del ligando. Los mismos tipos de moléculas núcleo y el mismo grado de conjugación se aplican para el poli(análogo del ligando) que para el

poli(ánalogo del ligando)-poli(cromóforo). Sin embargo, el análogo del ligando puede estar presente en una proporción mucho mayor de la que el núcleo central puede acomodar en el receptor. Por lo tanto, cuando son esenciales un número mínimo de grupos de análogo del ligando, el número máximo es el que convenga. El factor importante es que las moléculas de receptor, cuando están unidas al poli(análogo del ligando), puedan aproximarse lo suficiente para permitir que los cromóforos entren dentro de la distancia de extinción.

Al elegir una molécula núcleo, influirán sobre la elección varias consideraciones. Aunque no es esencial que la molécula núcleo sea soluble en el agua, en la mayor parte de los casos, esto será conveniente. En cualquier caso, la molécula o composición núcleo será capaz de dispersarse de manera estable en un medio acuoso. En segundo lugar, la molécula núcleo no debe absorber luz de la longitud de onda de emisión del fluoroscador originando una extinción importante. En tercer lugar, la molécula núcleo no debe emitir fluorescencia a las longitudes de onda de emisión del fluoroscador cuando es irradiada con la luz excitante. Por lo tanto, cualquier absorción importante por la molécula del núcleo debe ser inferior a aproximadamente 520 nm preferiblemente inferior a aproximadamente 450 nm.

La molécula núcleo debe tener un alto número de funciones, preferiblemente con grupos amino o hidroxilo, aunque también son utilizables otras funciones reactivas, por ejemplo, carboxi. En cuarto lugar, la molécula núcleo debe ser estable en las condiciones de almacenamiento y uso. En quinto lugar, la molécula núcleo debe ser inerte a las funciones presentes en el cromóforo y en el ligando que sean diferentes de la función para enlace. Finalmente, la molécula núcleo no debe interferir con el ensayo de inmunidad, por ejemplo, por tener receptores naturales que puedan estar presentes en los líquidos fisiológicos que se estudian.

Aunque se puede emplear cualquier tamaño de molécula, las moléculas o células muy grandes crearán problemas prácticos. Por ejemplo, una molécula muy grande que pasa a través del haz de luz del fluorímetro, podría producir un brusco incremento de la altura máxima. Por lo tanto, la señal obtenida tendría que ser promediada a lo largo de un periodo de tiempo razonable. Las moléculas grandes darán también como resultado una mayor dispersión, pero la dispersión podría compensarse mediante un sistema óptico apropiado. Preferiblemente, en su mayor parte, se emplearán moléculas que sean inferiores a un peso molecular de aproximadamente 10 millones, más preferiblemente de un peso molecular comprendido entre

aproximadamente 30.000 a 1.000.000.

Cromóforo.

Como los anticuerpos están presentes normalmente en el medio de ensayo, y las proteínas absorben luz de longitudes de onda de hasta aproximadamente 310 nm, el fluorescedor tendrá una absorción substancial mayor de 310 nm, normalmente mayor de 350 nm y, preferiblemente, mayor de aproximadamente 400 nm. La elección del fluorescedor estará regulada, también, por el ligando particular de interés. El fluorescedor debe absorber luz de una longitud de onda mayor que el ligando o el análogo del ligando de interés. Es deseable un elevado coeficiente de extinción, en gran exceso de 10, preferiblemente en exceso de 10^3 y, particularmente preferido, en exceso de 10^4 . El fluorescedor debe disponer de un buen rendimiento cuántico en el medio acuoso. Por razones de conveniencia, el máximo de absorción del fluorescedor no debe variar de manera significativa con la variación del ligando.

En los artículos anteriormente indicados se describen varios fluorescedores diferentes; a saber, Stryer, supra, y Brand y otros, supra.

Un grupo de fluorescedores que tienen varias de las propiedades deseables descritas anteriormente, son los colorantes xanténicos, que incluyen las fluoresceínas

derivadas del 3,6-dihidroxi-9-fenil-xanthidrol, y las rosaminas y rodaminas, derivadas del 3,6-diamino-9-fenil xanthidrol. Las rodaminas y las fluoresceínas tienen un grupo 9-o-carboxifenilo y son derivados del 9-o-carboxifenil xanthidrol.

Estos compuestos se pueden adquirir comercialmente con substituyentes sobre el grupo fenilo, que pueden ser utilizados como el punto para enlace o como la función de enlace. Por ejemplo, se pueden adquirir compuestos de fluoresceína substituidos por amino y por iso-tiocianato.

Otros grupos de compuestos fluorescentes son las naftilaminas, que tienen un grupo amino en la posición alfa o beta, generalmente, en la posición alfa.

Incluidos entre los compuestos de naftilamino están el 1-dimetilaminonaftil-5-sulfonato, 1-anilino-8-naftalensulfonato y 2-p-toluidinil-6-naftalensulfonato.

Otros colorantes incluyen la 3-fenil-7-isocianatocumarina, las acridinas, tales como la 9-isotiocianatoacridina y el naranja de acridina; N-(p-(2-benzoxazolil)fenil)maleimida; benzoxadiazoles, tales como 4-cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol y 7-(p-metoxibencilamino)-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol; estilbenos, tales como 4-dimetilamino-4'-isotiocianatoestilbeno y 4-dimetilamino-4'-maleimidoestilbeno; p-toluensulfonato de N,N'-dioctadeciloxacarbocianina; pirenos, tales como ácido 8-hidroxi-

-1,3,6-pirenotrisulfónico, y ácido 1-pirenobutírico, merocianina 540, colorante Rose Bengal, 2,4-difenil-3--(2H)-furanona, así como otras moléculas fluorescentes fácilmente asequibles. Estos colorantes, o bien tienen funciones activas o dichas funciones pueden ser fácilmente introducidas.

Consideraciones similares a las referentes a la molécula del fluoroscador, son aplicables a la molécula extinguidora, a excepción de que no se requiere un buen rendimiento cuántico fluorescente cuando se está midiendo la fluorescencia del fluoroscador. Una consideración adicional para la molécula extinguidora es que ésta tiene su absorción para una longitud de onda de emisión del fluoroscador. Es deseable un buen solapamiento de la emisión del fluoroscador y de la absorción del extinguidor.

Debe advertirse que tanto las características de absorción como las de emisión del colorante pueden variar entre cuando está libre en solución y cuando está unido a una proteína o ligando. Por lo tanto, cuando se hace referencia a los diversos márgenes y características de los colorantes, se pretende indicar el colorante tal como se emplea y no el colorante que no está conjugado y que está caracterizado en un disolvente arbitrario. En la zona de solapamiento entre la fluorescencia

cia y la extinción, el extinguidor debe tener coeficientes de extinción del mismo orden o superiores que los expuestos para la absorción por la molécula fluorescente.

Ligando

Como se ha indicado, el ligando variará ampliamente, teniendo normalmente un peso molecular de por lo menos 110, más generalmente de por lo menos 125, siendo el peso molecular máximo ilimitado, aunque sin exceder generalmente de 10 millones. Generalmente, el factor importante en lo que concierne a un ligando es que se pueda disponer de, o preparar, un receptor para el ligando. Normalmente se pueden preparar receptores para la mayor parte de los compuestos orgánicos que tengan una función polar. A los compuestos para los cuales se pueden formar anticuerpos mediante la unión del compuesto a un compuesto que tiene propiedades antigénicas, se hace referencia como haptenos. A aquellos compuestos que suscitan la formación de anticuerpos sin modificación química, se hace referencia como antígenos. Véanse Kabat y otros, Experimental Immunochimistry, Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, 1967.

Los ligandos no polímeros de interés tendrán, normalmente, un peso molecular comprendido entre aproximadamente 125 y 2.000. Estos compuestos comprenden una

amplia variedad de compuestos de diversas estructura, funcionalidad y propiedades fisiológicas. Los compuestos pueden ser acíclicos, alicíclicos o heterocíclicos, tanto monocíclicos como policíclicos. Los heteroátomos implicados incluyen oxígeno, nitrógeno, azufre, halógeno (flúor, cloro, bromo y yodo) boro, fósforo, cationes metálicos de los grupos 1A y 2A de la Tabla Periódica, metales de transición y similares.

Los grupos funcionales incluyen alcoholes, éteres, ácidos carboxílicos, esterres y amidas, aminas (primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias) halógenos, nitrilo, mercaptano y similares. Normalmente, los compuestos estarán constituidos solamente por carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, halógeno y fósforo, en particular, por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno y cuando hay sales implicadas, el apropiado contraión metálico o contraión amónico.

Los anillos heterocíclicos que están presentes incluyen pirrol, piridina, piperidina, indol, tiazol, piperazina, pirano, cumarina, pirimidina, purina, triazina, imidazol y similares.

Debido a la amplia variedad de compuestos que pueden ser determinados de acuerdo con el ensayo de que se trata, los diferentes grupos serán divididos en varias categorías, frecuentemente artificiales, bien sea por

la presencia de una función o estructura de anillo particulares, o debido a que comparten una función particular o debido a que se reconocen como una clase.

La primera clase de compuestos de interés son aquellos que tienen un grupo amino, bien sea como miembro heterocíclico o como una función en una cadena alifática. Estos compuestos tendrán, normalmente, un peso molecular comprendido entre aproximadamente 110 y 800, más generalmente un peso molecular comprendido entre aproximadamente 125 a 650. Estos compuestos tienen, frecuentemente, un grupo amino separado de un anillo bencénico por 2 ó 3 átomos de carbono alifáticos.

El primer grupo de compuestos de interés son los alcaloides y los metabolitos de aquellos alcaloides que se ingieren. El primer grupo de alcaloides importantes son los alcaloides del grupo de la morfina. Incluidos en este grupo están la morfina, la codeína, la heroína, el glucurónido de morfina y similares.

El siguiente grupo de alcaloides son los alcaloides de la cocaína, que incluyen, particularmente como metabolitos, la benzoil-ecgonina y la ecgonina.

Otro grupo de alcaloides son los alcaloides de la cincona que incluyen la quinina.

El grupo de alcaloides de la isoquinoleína incluye la mescalina.

El grupo de alcaloides de la bencilisoquinolefina incluye la papaverina.

El grupo de alcaloides de la ftalidoisoquinolefina incluye la narcotina, la narcefina y la cotarnina.

El grupo de alcaloides de la indolopiridocolina incluye la yohimbina y la reserpina.

El grupo de alcaloides de la ergotamina incluye la ergotamina y el ácido lisérgico.

Otros grupos de alcaloides son los alcaloides de la estricnina, los alcaloides de la piridina, los alcaloides de la piperidina, los alcaloides de la pirrolizidina y similares.

Los alcaloides de interés principal son aquellos que entran dentro de la categoría de drogas estupefacientes, tales como morfina, cocaína, mescalina y ácido lisérgico, las cuales pueden ser analizadas en forma del propio compuesto o de su metabolito, dependiendo del líquido fisiológico que sea analizado para determinar su presencia.

Varias drogas sintéticas imitan las propiedades fisiológicas, parcialmente o en su totalidad, de las drogas estupefacientes de origen natural. Incluidas entre estas drogas están la metadona, meperidina, anfetamina, metanfetamina, glutetimida, difenilhidantoína, y las drogas que entran dentro de la categoría de los benzodiazos

cicloheptanos, fenotiazinas y barbituratos.

Las drogas de interés debido a sus propiedades fisiológicas, son aquellas a las que se hace referencia como catecolaminas. Entre las catecolaminas están la epinefrina, efedrina, L-dihidroxifenilalanina y la norepinefrina.

Otras drogas de interés son los tranquilizantes Meprobamate, Tergitol y succinimidas, tales como Ethoxsulfide.

Otros compuestos de interés son el tetrahidrocannabinol, cannabinol, y sus derivados, principalmente los compuestos derivados de la marihuana, sus modificaciones sintéticas y sus metabolitos.

Otros grupos de compuestos de interés importante son los esteroides. Los esteroides incluyen los estrógenos, gestógenos, andrógenos, hormonas adrenocorticales, ácidos biliares, glicoides cardiotónicos, aglicones, saponinas y sapogeninas.

Otra clase de compuestos son las vitaminas, tales como la vitamina A, las del grupo B, por ejemplo la vitamina B₁, B₆ y B₁₂, la E, la K y similares.

Otra clase de compuestos son los azúcares, tanto los monosacáridos como los polisacáridos, particularmente los disacáridos y los polisacáridos de orden superior.

Otra clase de compuestos son las prostaglandinas.

Otra clase de compuestos son los aminoácidos, polipéptidos y proteínas. Los polipéptidos abarcan generalmente entre 2 y 100 unidades de aminoácido (generalmente de un peso molecular inferior a aproximadamente 12.000). Los polipéptidos mayores se denominan arbitrariamente proteínas y están compuestos, generalmente, por entre aproximadamente 1 y 20 cadenas de polipéptido. El término poli(aminoácido) se utilizará como genérico para los polipéptidos y las proteínas. De interés particular entre los aminoácidos son las tironinas, tanto las triyodotironinas como las tetrayodotironinas. Los poli(aminoácidos) empleados en esta invención que emplean dos anticuerpos como reactivos, estarán comprendidos generalmente en un margen de pesos moleculares entre 5.000 y 10^7 , generalmente entre 10^4 y 10^6 . De interés particular entre los polipéptidos y las proteínas [poli(aminoácidos)] son las hormonas, globulinas, antígenos y composiciones que se ha encontrado tienen actividades fisiológicas específicas.

La amplia variedad de proteínas puede ser considerada como la familia de proteínas que tienen características estructurales similares, las proteínas que tienen funciones biológicas particulares, las proteínas relacionadas con microorganismos específicos, en particular los microorganismos que causan enfermedades, etc.

Las siguientes son clases de proteínas relacionadas por su estructura:

protaminas

histonas

albúminas

globulinas

escleroproteínas

fosfoproteínas

mucoproteínas

cromoproteínas

lipoproteínas

nucleoproteínas

proteínas no clasificadas, por ejemplo, somatotropinas, prolactina, insulina, pepsina.

Varias de las proteínas encontradas en el plasma humano son clínicamente importantes e incluyen:

Frealbúmina

Albúmina

γ_1 -lipoproteína

α_1 -ácido glicoproteínico

α_1 -antitripsina

α_1 -glicoproteínas

Transcortina

4,6S-postalbúmina

Triptófano-pobre

α_1 -glicoproteína
 α_1, χ -glicoproteína
 Globulina fijadora de la tiroxina
 Inhibidor de la inter- α -tripsina
 Gc-globulina
 (Gc 1-1)
 (Gc 2-1)
 (Gc 2-2)
 Haptoglobina, (Hp 1-1)
 (Hp 2-1)
 (Hp 2-2)
 Ceruloplasmina
 Colinesterasa
 α_2 -lipoproteína(s)
 α_2 -macroglobulina
 α_2 -HS-glicoproteína
 $Z_n - \alpha_2$ -glicoproteína
 α_2 -neuramino-glicoproteína
 Eritropoietina
 β -lipoproteína
 Transferrina
 Hemopexina
 Fibrinógeno
 Plasminógeno
 β_2 -glicoproteína I

β_2 -glicoproteína II

Immunoglobulina G

(IgG) o γ G-globulina

Fórmula molecular:



Immunoglobulina M

(IgM) ó μ M-globulina

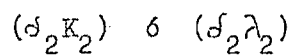
Fórmula molecular



Immunoglobulina D (IgD)

ó δ D-Globulina (δ D)

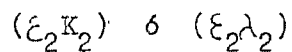
Fórmula molecular:



Immunoglobulina E (IgE)

ó ϵ E-Globulina (ϵ E)

Fórmula molecular:



Cadenas ligeras libres.

Factores complementarios:

C'1

C'1q

C'1r

C'1s

C'2

C'3

β_1^A
 α_2^D
 C'4
 C'5
 C'6
 C'7
 C'8
 C'9

Los factores coagulantes de la sangre importantes incluyen:

TABLA VII
FACTORES COAGULANTES DE LA SANGRE

Designación Internacional	Nombre
I	Fibrinógeno
II	Protrombina
IIa	Trombina
III	Tromboplastina de tejidos
V y VI	Proacelerina, globulina <u>ace</u> leradora
VII	Proconvertina
VIII	Globulina antihemofílica (AHG)
IX	Factor de Christmas, compo- nente de tromboplastina del plasma (PTC)

Continuación

Designación Internacional	Nombre
X	Factor de Stuart-Prower, autoprotrombina III
XI	Antecedente de tromboplastina del plasma (PTA)
XII	Factor de Hagemann
XIII	Factor estabilizador de la fibrina

Las hormonas proteínicas importantes incluyen:

Hormonas peptídicas y proteínicas.

Hormona paratiroidea

(parathormona)

Tirocalcitonina

Insulina

Glucagon

Relaxina

Eritropoietina

Melanotropina

(hormona estimuladora de los melanocitos; in
termedina)

Somatotropina

(hormona del crecimiento)

Corticotropina

(hormona adrenocorticotrópica)

Tirotropina

Hormona estimuladora de los folículos

Hormona luteinizante

(hormona estimuladora de las células intersticiales)

Hormona luteomamotrópica

(luteotropina, prolactina)

Gonadotropina

(gonadotropina coriónica)

Hormonas de los tejidos

Secretina

gastrina

angiotensina I y II

bradiquinina

lactógeno placentario humano.

Hormonas peptídicas procedentes de la neurohipófisis.

Oxitocina

vasopresina

factores liberadores (RF)

GRF, LRF, TRF, somatotropina-RF

GRF, FSH-RF, PIF, MIF.

Otros materiales polímeros de interés son los mucopolisacáridos y los polisacáridos.

Los siguientes son polisacáridos antigénicos ilustrativos, derivados de microorganismos:

<u>Especies de microorganismos</u>	<u>Hemosensitina encontrada en:</u>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Polisacárido
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	Polisacárido
<i>Neisseria meningitidis</i>	Polisacárido
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Polisacárido
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Polisacárido
<i>Actinobacillus mallei</i> ; <i>Actinobacillus whitemori</i>	Extracto crudo
<i>Francisella tularensis</i>	Lipopolisacárido Polisacárido
<i>Pasteurella pestis</i>	
<i>Pasteurella pestis</i>	Polisacárido
<i>Pasteurella multocida</i>	Antígeno capsular
<i>Brucella abortus</i>	Extracto crudo
<i>Haemophilus influenzae</i>	Polisacárido
<i>Haemophilus pertussis</i>	Crudo
<i>Treponema reiteri</i>	Polisacárido
<i>Veillonella</i>	Lipopolisacárido
<i>Erysipelothrix</i>	Polisacárido
<i>Listeria monocytogenes</i>	Polisacárido
<i>Chromobacterium</i>	Lipopolisacárido
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Extracto salino de la fracción de micobacterias y polisacáridos de células y tuberculina, extraída con fenol al 90%

<i>Klebsiella aerogenes</i>	Polisacárido
<i>Klebsiella cloacae</i>	Polisacárido
<i>Salmonella typhosa</i>	Lipopolisacárido Polisacárido
<i>Salmonella typhi-murium</i> ; <i>Salmonella derby</i> <i>Salmonella pullorum</i>	Polisacárido
<i>Shigella dysenteriae</i>	Polisacárido
<i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella sonnei</i>	Polisacárido crudo
<i>Rickettsiae</i>	Extracto crudo
<i>Candida albicans</i>	Polisacárido
<i>Entamoeba histolytica</i>	Extracto crudo

Otro grupo de compuestos son los antibióticos, tales como penicilina, actinomicina, cloromicetina y similares.

Los compuestos individuales de interés son la serotonina, espermina y el ácido fenilpirúvico.

Finalmente, los compuestos que son plaguicidas, tales como fungicidas, insecticidas, bactericidas y nematocidas, pueden ser también de interés para el ensayo.

Aparte de los compuestos de interés, células, virus y otros agregados biológicos que son antigénicos o para los que se pueden encontrar receptores de origen natural, pueden también ser ensayados.

Los microorganismos que se ensayan pueden estar intactos, sometidos a lisis, molidos o fragmentados de otro modo, y la composición o porción resultante, por ejemplo

por extracción, ser sometida a ensayo. Los microorganismos de interés incluyen:

Corynebacteria

Corynebacterium diphtheriae

Pneumococci

Diplococcus pneumoniae

Streptococci

Streptococcus pyogenes

Streptococcus salivarius

Staphylococci

Staphylococcus aureus

Staphylococcus albus

Neisseriae

Neisseria meningitidis

Neisseria gonorrhoeae

Enterobacteriaceae

Escherichia coli)

Aerobacter aerogenes)

Klebsiella pneumoniae)

Bacterias coliformes

Salmonella typhosa)	Salmonelas
Salmonella choleraesuis		
Salmonella typhimurium		
Shigella dysenteriae)	Shigellas
Shigella schmitzii		
Shigella arabinotarda		
Shigella flexneri		
Shigella boydii		
Shigella Sonnei)	

Other enteric bacilli

Proteus vulgaris)	Especies Proteus
Proteus mirabilis		
Proteus morgani		
Pseudomonas aeruginosa		
Alcaligenes faecalis		
Vibrio cholerae		

Grupo Hemophilus-Bordetella

Hemophilus influenzae,	H. ducreyi
	H. hemophilus
	H. aegypticus
	H. parainfluenzae
Bordetella pertussis	

Pasteurellae

Pasteurella pestis
Pasteurella tularensis

Brucellae

Brucella melitensis
Brucella abortus
Brucella suis

Bacilos formadores de esporas aerobias

Bacillus anthracis
Bacillus subtilis
Bacillus megaterium
Bacillus cereus

Bacilos formadores de esporas anaerobias

Glostridium botulinum
Glostridium tetani
Glostridium perfringens
Glostridium novyi
Glostridium septicum
Glostridium histolyticum
Glostridium tertium
Glostridium bifermentans
Glostridium sporogenes

Mycobacteria

Mycobacterium tuberculosis hominis
Mycobacterium bovis
Mycobacterium avium
Mycobacterium leprae
Mycobacterium paratuberculosis

Actinomicetos (bacterias tipo hongo)

Actinomyces israelii
Actinomyces bovis
Actinomyces naeslundii
Nocardia asteroides
Nocardia brasiliensis

Espiroquetas

Treponema pallidum Spirillum minus
Treponema pertenu Streptobacillus moniliformis
Treponema carateum
Borrelia recurrentis
Leptospira icterohemorrhagiae
Leptospira canicola

Mycoplasmae

Mycoplasma pneumoniae

Otros patógenos

Listeria monocytogenes
Erysipelothrix rhusiopathiae
Streptobacillus moniliformis
Donvania granulomatis
Bartonella bacilliformis

Rickettsiae (parásitos tipo bacteria)

Rickettsia prowazekii
Rickettsia mooseri
Rickettsia rickettsii
Rickettsia conori
Rickettsia australis
Rickettsia sibiricus
Rickettsia akari
Rickettsia tsutsugamushi
Rickettsia burnetii
Rickettsia quintana

Chlamydia (parásitos bacterianos/virales inclasificables).

Agentes chlamydia (nombre incierto)

Hongos

Cryptococcus neoformans
Blastomyces dermatidis

Histoplasma capsulatum
 Coccidioides immitis
 Paracoccidioides brasiliensis
 Candida albicans
 Aspergillus fumigatus
 Mucor corymbifer (Absidia corymbifera)
 Rhizopus oryzae }
 Rhizopus arrhizus }
 Rhizopus nigricans } Ficomicetos
 Sporotrichum schenkii
 Fonsecaea pedrosoi
 Fonsecaea compacta
 Fonsecaea dermatitidis
 Cladosporium carrionii
 Phialophora verrucosa
 Aspergillus nidulans
 Madurella mycetomi
 Madurella grisea
 Allescheria boydii
 Phialospora jeanselmei
 Microsporum gypseum
 Trichophyton mentagrophytes
 Keratinomyces ajelloi
 Microsporum canis
 Trichophyton rubrum

Microsporium andouini

Virus

Adenovirus

5) Virus de herpes

Herpes simplex

Varicella (Chicken pox)

Herpes Zoster (Shingles)

Virus B

) Cytomegalovirus

Virus productores de erupciones pustulosas.

Variola (viruela)

Vaccinia

Virus de la viruela bovina

Paravaccinia

Molluscum contagiosum

Picornavirus

Virus de la poliomielitis

Virus de Coxsackie

Virus de Echo

Rhinovirus

Mixovirus

Influenza (A, B, y C)
Parainfluenza (1-4)
Virus de las paperas
Virus de la enfermedad de Newcastle
Virus del sarampión
Virus de la morriña
Virus del moquillo canino
Virus Syncytial Respiratorio
Virus de la rubéola

Arborvirus

Virus de la encefalitis equina del Este
Virus de la encefalitis equina del Oeste
Virus de Sindbis
Virus de Chikungunya
Virus de la selva de Semliki
Virus Mayora
Virus de la encefalitis de San Luis
Virus de la encefalitis de California
Virus de la fiebre de la garrapata de Colorado
Virus de la fiebre amarilla
Virus del dengue.

Reovirus

Tipos de reovirus 1-3

Hepatitis

Virus de hepatitis A

Virus de hepatitis B

Virus de los tumores

Virus de la leucemia de Rauscher

Virus Gross

Virus de la leucemia de Maloney

Virus de la leucemia de Friend

Virus del tumor de la mama de la rata

Virus de la leucosis Avian

Virus del sarcoma de Rous

Virus polyoma

Virus 40 del simio

Virus del papiloma.

Las preparaciones de microorganismos incluyen:

Streptococcus pyogenes, proteína

Pasteurella pestis, toxina proteínica

Clostridium tetani, toxoide

Clostridium perfringens, α -lecitinasa

Escherichia coli, filtrados
Treponema reiteri, extracto proteínico
Corynebacterium diphtheriae, toxina, toxoide
Mycobacterium tuberculosis, proteína
M. tuberculosis, citoplasma
M. tuberculosis filtrado de cultivo y tuberculina
Mycoplasma pneumoniae, antígeno "crudo".

Ensayo de inmunidad

Los ensayos de inmunidad del invento, están basados en el grado de extinción que tiene lugar en una solución cuando se irradian moléculas fluorescentes con la luz absorbida por el fluorescedor, preferiblemente dentro del máximo de absorción, como una función de la cantidad de ligando en el medio. Así, el número de moléculas de fluorescedor y de extinguidor que se reúnen dentro de una distancia en la que puede producirse la extinción, está relacionado con la cantidad de ligando presente en el medio de ensayo.

El ensayo puede realizarse con receptores para el ligando (antiligando) conjugado con el cromóforo (antiligando) - cromóforo o con el receptor para el antiligando (anti-(antiligando)) conjugado con el cromóforo (anti(antiligando)-cromóforo). Por razones que se expondrán subsiguientemente, esta técnica (la técnica del receptor

doble) proporciona ventajas de procedimiento, proporcionando asimismo capacidades de ensayo de que no se dispone con la técnica del receptor simple. La técnica del receptor doble une el receptor-cromóforo indirectamente con el ligando, a través de un intermediario receptor (antiligando), que permite ahora un grado adicional de libertad en la variación de los reactivos.

En la realización del ensayo que emplea la técnica del receptor simple, el reactivo análogo del ligando tiene el análogo del ligando unido, bien sea directamente (covalentemente) a un cromóforo, análogo del ligando $(Ch_2)_x$ o poli(análogo del ligando)-poli (Ch_2) , o bien indirectamente (a través del receptor- Ch_2) a un cromóforo (Ch_2) . Seguidamente, el ensayo se realiza por combinación en el medio de ensayo del ligando unido al Ch_2 , del receptor $-Ch_1$, y de la sustancia desconocida. Son permisibles diversos órdenes de adición. Cuando el análogo del ligando ha de unirse indirectamente al Ch_2 , el receptor $-Ch_1$ y el receptor $-Ch_2$ pueden ser añadidos paso a paso o de manera sustancialmente simultánea.

Convenientemente, el receptor- Ch_1 y el receptor $-Ch_2$ pueden ser combinados entre sí como un sólo reactivo en la proporción apropiada. De esta manera la proporción de los dos receptores comunes pueden ser cuidadosamente controlada y exactamente añadida a la mezcla de ensayo. La

mezcla puede ser una mezcla liofilizada seca o una solución acuosa, normalmente tamponada (pH 5-10; generalmente 6,5-8,5) de cualquier concentración deseada.

La concentración de ligando de interés estará comprendida generalmente en el margen de aproximadamente 10^{-4} a 10^{-14} , más generalmente entre aproximadamente 10^{-6} a 10^{-12} M., lo más generalmente, de 10^{-6} a 10^{-10} M. Las concentraciones de reactivos reflejarán la concentración de interés del ligando.

El medio será normalmente acuoso teniendo un porcentaje en volumen de 0 a 40 y, más generalmente, de 0 a 20, de un disolvente orgánico polar. Los disolventes orgánicos polares ilustrativos incluyen etilenglicol, etanol, carbitol, dimetilformamida, sulfóxido de dimetilo y similares. Preferiblemente, el medio acuoso estará substancialmente libre de otros disolventes polares. El medio será tamponado normalmente en el margen de aproximadamente 5 a 10, preferiblemente entre aproximadamente 6,5 y 8,5 y, más preferiblemente, entre aproximadamente 7 y 8,5. Se pueden utilizar diversos tampones, tales como borato, fosfato, carbonato, ácido barbitúrico, tris y similares. El tampón particular empleado no es esencial para esta invención, pero en ensayos particulares, se puede preferir un tampón a otro. La concentración de tampón estará comprendida normalmente en el margen de aproximadamente

0,005 M a 0,5 M, más generalmente entre aproximadamente 0,01 M y aproximadamente 0,1 M.

Durante el ensayo, se emplearán normalmente temperaturas moderadas, comprendidas generalmente entre aproximadamente 0°C y 45°C, más generalmente comprendidas en el margen de aproximadamente 15°C a 40°C. La temperatura particular escogida dependerá de lo que convenga, y del efecto de la temperatura sobre la eficacia de la fluorescencia, y de la constante de enlace del receptor con el ligando.

El rendimiento del ensayo será mejorado a las temperaturas más bajas, puesto que se acrecientan tanto la eficacia de la fluorescencia como las constantes de enlace.

Por razones de conveniencia, los ensayos con receptor simple se dividirán en aquellos en los que el ligando está unido covalentemente al cromóforo y aquellos en los que el ligando está unido indirectamente a través del receptor al cromóforo.

El primer ensayo a considerar será con aquellas composiciones en las que el cromóforo está unido covalentemente al ligando. Como se ha indicado anteriormente, un sólo cromóforo puede estar unido a un solo ligando o, empleando una molécula núcleo, una pluralidad de ligandos pueden estar unidos a una pluralidad de grupos cro-

móforos. Alternativamente, con grandes ligandos, tales como proteínas, una pluralidad de grupos cromóforos pueden estar unidos al ligando.

El análogo del ligando-cromóforo estará generalmente a una concentración no mayor de 100 veces la concentración máxima y no inferior a 0,01 veces la concentración mínima del margen de concentraciones de interés, estando más generalmente en el margen comprendido entre la concentración máxima de interés y no menos de 0,1 veces la concentración mínima de interés y, preferiblemente, dentro de un orden de magnitud o de un factor de 10 de la concentración mínima de interés. La concentración de receptor-cromóforo se determina entonces, mediante la adición de una cantidad suficiente del receptor para obtener por lo menos una extinción del 10%, preferiblemente por lo menos una extinción del 20%, y hasta una extinción del 100%, generalmente una extinción comprendida entre aproximadamente 20 y 80% y, preferiblemente, una extinción comprendida entre aproximadamente 50 y 80%. La cantidad de receptor-cromóforo empleada estará relacionada con la constante de enlace, con la concentración de interés que afecta a la concentración del ligando-cromóforo, con la sensibilidad del instrumento y similares.

Aunque el cromóforo unido al ligando puede ser extinguidor, la mayor parte de las veces, el cromóforo

unido al ligando será fluorescedor. Esto no es una cuestión de operabilidad, sino más bien de conveniencia. En la mayor parte de los casos, el receptor es un anticuerpo, que será una mezcla de proteínas complejas, conteniendo un anticuerpo para el ligando así como otros anticuerpos y proteínas. Cuando la composición de anticuerpo está marcada con el cromóforo, una proporción sustancial del cromóforo estará unida a una proteína distinta del anticuerpo para el ligando (antiligando). Por lo tanto, si el fluorescedor estaba unido al receptor, esto dará como resultado una gran fluorescencia de fondo en el medio de ensayo. Alternativamente, cuando se dispone de una muestra de antiligando relativamente pura, el procedimiento preferido será unir el ligando al extinguidor, en lugar de al fluorescedor.

El orden particular de adición de los diversos materiales al medio de ensayo no es esencial para esta invención. La sustancia desconocida y el análogo del ligando-cromóforo pueden ser combinados simultáneamente con el receptor-cromóforo o se pueden añadir los materiales secuencialmente. Preferiblemente, la sustancia desconocida se combina con el receptor-cromóforo y se incuba durante un tiempo suficiente para aproximarse al equilibrio. Por lo tanto, los puntos de enlace disponibles del receptor se reducen en proporción con la cantidad de sustancia des-

conocida presente en el medio de ensayo. El análogo del ligando-cromóforo puede añadirse seguidamente e incubarse y transfiriendo luego la solución a un fluorímetro y determinando la intensidad de la fluorescencia por excitación con luz de una longitud de onda o longitudes de onda absorbidas por el fluorescedor.

Los tiempos de incubación dependerán de la temperatura empleada, de la constante de enlace del receptor y de las concentraciones de los materiales presentes en el medio de ensayo. Normalmente, los tiempos de incubación serán de por lo menos aproximadamente 5 segundos y, preferiblemente, no excederán de aproximadamente 6 horas, estando más generalmente en el margen de aproximadamente 30 segundos a 2 horas, preferiblemente de 1 a 30 minutos. Las temperaturas de incubación variarán generalmente entre aproximadamente 15° y 40°C.

Empleando una serie de soluciones que tienen concentraciones conocidas de ligando, se puede obtener una curva patrón que relaciona la fluorescencia o el porcentaje de extinción con la concentración del ligando. La fluorescencia que resulta de un medio de ensayo con una sustancia desconocida puede ser entonces relacionada directamente con la concentración de la sustancia desconocida en el medio de ensayo.

En un segundo modo de operación, en el que el ligand

do está unido indirectamente a un cromóforo, el antiliga-
gando se divide en dos partes y una parte se conjuga con
el fluorescedor y la otra parte se conjuga con el extin-
guidor. Este modo de operación requiere o bien que el
ligando tenga una pluralidad de puntos determinantes o
epitópicos o, alternativamente, que cuando el ligando
tiene solamente uno o dos puntos epitópicos, se prepare
un poli(análogo del ligando). Es decir, que el ligando
solamente puede acomodarse a unos pocos, generalmente de
aproximadamente 1 a 2 anticuerpos, simultáneamente. Co-
mo se ha indicado anteriormente se prepara el poli(análo-
go del ligando) mediante la conjugación del análogo del
ligando con una molécula núcleo de alto peso molecular.

En el ensayo en el que el ligando está conjugado
covalentemente al cromóforo, la respuesta del ensayo que
va de la ausencia de ligando a concentraciones crecien-
tes de ligando, es una curva suave con fluorescencia cre-
ciente, hasta que se obtiene la máxima cantidad de fluo-
rescencia. Se observa un resultado similar cuando se
emplea poli(análogo del ligando) para medir el ligando
y el receptor-fluorescedor y el receptor-extingui-
dor. Sin embargo, con un antígeno, que tiene una pluralidad
de puntos determinantes y solamente el receptor-extingui-
dor y el receptor-fluorescedor se añaden a la sustancia
desconocida que ha de ser ensayada, para una concentra-

ción de antígeno cero, existe un máximo de fluorescencia que disminuye al aumentar la concentración de antígeno hasta alcanzar un mínimo y, seguidamente, aumenta de nuevo hasta la fluorescencia máxima.

La causa de este resultado bifásico es directa. Cuando se añade el antígeno, el extinguidor y el fluoroscador se reúnen sobre la superficie del antígeno, de tal modo que se produce algo de extinción. Al aumentar la concentración de antígeno, se reúnen en la superficie del antígeno cada vez más cantidad de los dos receptores, aumentando la extinción. Sin embargo, para cierta concentración, la extinción alcanza un máximo (la fluorescencia alcanza un mínimo). Al aumentar el antígeno, la cantidad de receptor unido a cualquier antígeno disminuye de tal modo que la cantidad de extinción disminuye también. Finalmente, para elevadas concentraciones de antígeno, la cantidad de receptor unida a cualquier antígeno es insuficiente para proporcionar la extinción. Por lo tanto, cuando el ensayo pretende determinar el antígeno, es necesario realizar el ensayo con dos diferentes diluciones del antígeno. De esta manera, se puede determinar si una está en la porción declinante de la curva o en la porción creciente de la misma.

La concentración de poli(análogo del ligando), basada en el análogo del ligando disponible, caerá dentro de

los mismos márgenes indicados para el ligando unido covalentemente al cromóforo.

Al realizar el ensayo con los dos receptores conjugados, por ejemplo anticuerpos, el antígeno se combina con los anticuerpos generalmente en presencia de aproximadamente 0,1 a 1 mg/ml de una proteína, por ejemplo albúmina, y se incuba durante un tiempo suficiente, generalmente de aproximadamente 5 segundos a 6 horas, más generalmente de aproximadamente 1/2 minuto a 2 horas, preferiblemente de 1 a 30 minutos, a una temperatura comprendida en el margen de aproximadamente 15 a 40°C. Las consideraciones que determinan el tiempo de incubación han sido expuestas anteriormente.

Con el poli(análogo del ligando), se combinan los dos anticuerpos conjugados con la sustancia desconocida que ha de ensayarse, se incuban y se añade el poli(análogo del ligando) y se incuba adicionalmente la mezcla. Los tiempos y las temperaturas indicadas anteriormente son también aplicables en este ensayo.

Seguidamente, se introduce la muestra en un fluorímetro y se determina la fluorescencia por excitación con luz de la longitud de onda apropiada. La fluorescencia puede proceder del fluoroscador o del extinguidor, dependiendo de la banda de longitud de onda medida. El ensayo se puede realizar manualmente o puede ser automa

tizado.

El método del presente invento es fácilmente adaptable para determinar la presencia de anticuerpos o antígenos en un líquido fisiológico humano, utilizando un método en dos etapas y los receptor-cromóforos (Ch_1 y Ch_2) para la gamma-globulina, por ejemplo humana. Se puede diferenciar fácilmente, por la diferencia de peso molecular, entre la asociación de anticuerpos o de otras moléculas receptoras que están unidas a un antígeno, y los anticuerpos u otros receptores que están libres en solución.

Dependiendo de si se desea determinar la presencia o la ausencia de un antígeno o de anticuerpos en un líquido fisiológico humano, por ejemplo sangre, se añadiría el material complementario, generalmente en un exceso sustancial respecto de la máxima concentración de interés. Por ejemplo, si se desea determinar la presencia de anticuerpos en el suero para un antígeno particular, se añadiría el antígeno al líquido fisiológico y se separarían los componentes que tuvieran pesos moleculares mayores del peso molecular del anticuerpo (>160.000), por ejemplo, por centrifugación. Después de separar el precipitado del líquido sobrenadante, se vuelve a dispersar el precipitado y se somete a ensayo de acuerdo con la invención para determinar la presen-

cia de gamma-globulina humana. Solamente en presencia del antígeno habrá gamma-globulina humana presente en el precipitado. Por lo tanto, la presencia de gamma-globulina humana en el precipitado indica la presencia de anticuerpos para el antígeno del suero.

El método en dos etapas se puede utilizar para determinar una amplia variedad de antígenos y de anticuerpos, utilizando los mismos receptor-cromóforos. El método proporciona una determinación directa de anticuerpo para antígenos específicos. Los antígenos pueden ser determinados indirectamente mediante la adición de anticuerpos al líquido que se sospecha contiene el antígeno y, seguidamente, sometiéndolo a ensayo para determinar la presencia de anticuerpos en el precipitado después de la separación de los anticuerpos unidos y no unidos.

La técnica del receptor doble es una técnica homogénea que permite la determinación de haptenos, antígenos y antiligando, particularmente cuando el ligando es un antígeno poliepitópico.

En el modo más sencillo, para la detección de un ligando, el ligando se conjugaría con un cromóforo, particularmente un fluorescedor y un antiligando y un anti (anti-ligando)-cromóforo, particularmente un extinguidor, añadido a la solución de ensayo. De esta manera,

se podría unir un gran número de moléculas extinguidoras al ligando, mejorando la oportunidad de la extinción. En efecto, el antiligando se encarga de aumentar el número de moléculas extinguidoras capaces de unirse al ligando.

Las concentraciones de los reactivos se harán paralelas a las de los reactivos análogos para la técnica del receptor único, estando el anti(antiligando)-cromóforo en un exceso molar respecto al anti-ligando, siendo generalmente la proporción molar entre aproximadamente 1,5 y 10:1. Si se desea, se pueden emplear unidades F_{ab} individuales en lugar de IgG intacto.

El siguiente modo tiene ambos cromóforos indirectamente unidos al ligando. De esta manera, solamente se emplean antiligando y anti(antiligando)- Ch_1 y anti(antiligando)- Ch_2 . Sin embargo, antes de la introducción de estos reactivos, se combinará una porción del antiligando con el anti(antiligando)- Ch_1 y otra porción con el anti(antiligando)- Ch_2 de tal modo que queden unidos. Deseablemente, el anti(antiligando) será monofuncional, por ejemplo F_{ab} . El anti(antiligando) Ch_1 y $-Ch_2$ unidos al antiligando, proporcionan un reactivo comparable para el receptor $-Ch_1$ y para el receptor $-Ch_2$, respectivamente. Como se ha indicado anteriormente, se pueden emplear proporciones similares de anti(antiligando)-cromóforos a antiligando.

En una realización preferida, se emplean antiligandos de dos especies diferentes, por ejemplo especies de mamíferos, por ejemplo, de oveja y de vaca. En esta situación, los puntos epitópicos o hapténicos son diferentes para los dos antiligandos para el mismo ligando. Al referirse al antiligando procedente de dos fuentes diferentes, el antiligando irá precedido por una letra minúscula, por ejemplo, a-(antiligando). De este modo no es necesario combinar previamente el antiligando y el anti(antiligando)-cromóforo. Las proporciones de los diversos reactivos serán paralelas a las de los reactivos análogos de los ensayos anteriormente descritos.

Los reactivos cromóforos serían anti(a-antiligando)- Ch_1 y anti(b-antiligando)- Ch_2 . Así, Ch_1 estaría asociado solamente al a-(antiligando) y Ch_2 al b-(antiligando).

Esta técnica permite la determinación de asociaciones en solución, en las que los miembros de la asociación difieren por lo menos en un punto epitópico. Se puede preparar un a-(antiligando) para un miembro de la asociación y un b-(antiligando) para el otro miembro de la asociación. El extinguidor y el fluorescedor se reunirían solamente cuando los dos miembros estén unidos.

Utilizando un antiligando de dos fuentes diferentes, se puede emplear también, ventajosamente con un ligando, para evitar tener que combinar previamente el antiligando

do con el anti(antiligando)-cromóforo y, en situaciones en las que existe un enlace covalente entre dos entidades que pueden existir independientemente, por ejemplo, experimentando una reacción química.

Los reactivos pueden disponerse en viales separados, o mezclarse en un estado liofilizado seco, o en una solución acuosa, normalmente tamponada (pH 5-10, generalmente 6,5-8,5) de cualquier concentración deseada. Preferiblemente, el anti(a-antiligando) no sería combinado con un a-(antiligando) en solución como reactivo mucho tiempo antes de su uso. Convenientemente, los dos antiligandos podrían combinarse y los dos anti(antiligando)s.

Una ventaja particular de utilizar el receptor doble es que se puede emplear el mismo par de (anti(antiligando)-cromóforo)s con independencia del ligando, variando con el ligando solamente los pares de antiligando.

Para determinar la presencia de anticuerpos para un antígeno particular, se realizaría el ensayo como si se estuviera determinando el antígeno, a excepción de que se añadiría al medio de ensayo una cantidad conocida de antígeno. Cualquier anticuerpo presente en la sustancia desconocida, actuaría disminuyendo la cantidad del anti(antiligando)-cromóforo unida al antígeno y disminuyendo, así, la cantidad de extinción que tendría lugar en ausencia del anticuerpo. Como es natural, el antili

gando sería procedente de diferentes especies (distintas de los mamíferos) que el anticuerpo a determinar.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

PARTE EXPERIMENTAL

(Todas las temperaturas, a menos que se indique de otro modo, están en grados centígrados. Todas las partes, a menos que se indique de otro modo, son partes en peso. Todas las soluciones también son tampones acuosos. Todos los símbolos, a menos que se defina de otro modo, se pretende que tengan su significado normal).

Se emplean los siguientes símbolos:

IgG - gamma-globulina;

IgG(x) - anti-x;

R - tetrametilrodamina, por ejemplo RIgG(x) tetrametilrodamina conjugada con anti-x;

F - fluoresceína, por ejemplo FIgG(x) fluoresceína conjugada con anti-x; y

hIgG - gamma-globulina humana.

EJEMPLO I - Isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugado con O³-aminoatilmorfina (FLUMO'S')

A. Fluoresceinamina (0,5 g). (sigma, isómero I, puro, cromatografía en capa fina MeOH/CHCl₃ 1:3) se disolvió en 20 ml de acetona anhidra (secada sobre K₂CO₃ anhidro)

y se añadió gota a gota a la temperatura ambiente, a 3 ml de tiofosgeno en 5 ml de acetona, con fuerte agitación (1/2 horas). Se continuó la agitación durante una hora y el precipitado resultante, enfriado con un baño de hielo hasta 5°C, se filtró rápidamente a través de un embudo de vidrio sinterizado fino. El precipitado se lavó con acetona anhidra (3 ml) y, seguidamente, con 5 x 5 ml de HCl 6N mientras se trituraba con una espátula, hasta que todo él se volvía de un color rojo intenso, secando después bajo vacío (80° KOH) durante la noche. El isotiocianato obtenido era puro. (cromatografía en capa fina 50% MeOH/DMF).

B. O³-aminoetilmorfina (100 mg) se disuelve en 5 ml de acetona y se añade a una mezcla de acetona (20 ml), agua (5 ml) y trietilamina (0,07 ml). A esta solución se añade una solución de FITC (100 mg) en acetona (5 ml) gota a gota, con agitación durante 15 minutos. Se continúa la agitación durante 80 minutos adicionales, mientras se ajusta el pH de la mezcla de reacción a 9,5 con gotas de solución diluída de trietilamina en acetona (1,4 ml/10 ml, acetona). Seguidamente, se elimina parcialmente la acetona con un evaporador rotatorio a la temperatura ambiente. El producto se precipita, seguidamente, haciendo burbujear CO₂ a través de la solución, con adición simultánea de H₂O (hasta 10 ml) hasta que el pH desciende

a 6-6,5. El precipitado se filtra rápidamente sobre un embudo de vidrio sinterizado y se lava con solución de H_2CO_3 (2 ml, pH 6,0). Rendimiento 60 mg. El filtrado y las aguas de lavado se combinan y se obtiene una segunda producción, repitiendo el burbujeo de CO_2 como se ha descrito. Rendimiento 27 mg. El producto se seca durante la noche bajo vacío a 80° sobre P_2O_5 . Total 87 mg. El producto muestra una sola mancha por cromatografía de capa fina (50% metanol en dimetilformamida), $R_f = 0,45$.

EJEMPLO II.- Purificación y marcado de anticuerpo de morfina (IgG(m)) con isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC)

A. (a) Preparación de morfina - inmunoadsorbente.

Sepharose 4B activada con bromuro de cianógeno, fue copulada con hexametildiamina (8-10 micromoles/1 ml de gel de relleno) se preparó de acuerdo con las instrucciones de la compañía (Pharmacia, Upsala). Se suspendió gel húmedo (2,5 ml) en tampón de borato (10 ml, 0,1 N, pH 8,8), se añadió el anhídrido mixto de O^3 -carboximetil morfina y cloroformiato de isobutilo (0,1 milimoles, gran exceso) en dimetil formamida (2 ml), en frío ($0^\circ C$), y la mezcla se dejó reaccionar durante 3 horas. Se filtró el gel y se lavó sucesivamente con H_2O (500 ml), tampón de borato 0,1M, pH 9,0 (500 ml), H_2O (500 ml), HCl diluido +

+ NaCl 0,1 M, pH 2,5 (1500 ml), y H₂O (1000 ml). No se pudo detectar morfina al final de los lavados. La estimación de la morfina combinada se realizó mediante un método de hidrólisis con ácido acético diluido (Failla, y otros, Anal. Biochem., 52, 363 (1973)). El espectro ultravioleta se comparó con el de la O₃-carboximetilmorfina. El equivalente de morfina combinada era 5,05 micromoles/l ml de gel de relleno.

(b) Purificación de anticuerpo de morfina

El conjugado de morfina-Sepharose (2,5 ml) se introdujo como relleno en una columna de 6 mm de diámetro exterior y se lavó sucesivamente con 100 ml cada vez de tampón de borato 0,1 M, pH 9,0, H₂O, HCl diluido, pH 1,5, H₂O, y el mismo tampón de borato. Solución de IgG, de oveja, de reserva (7 ml, $2,18 \times 10^{-4}$ M puntos de unión) se aplicó a la columna, lavándose seguidamente con tampón de borato 0,1 M, pH 9,0, hasta que no se pudo detectar nada de proteína en el efluente (ultravioleta). Toda la actividad de antimorfina quedó retenida por la columna, como se determinó mediante medición por marcado por spin de morfina. (Véase la patente de Estados Unidos Nº 3.690.834). Se continuó el lavado con tampón de glicina-HCl 0,1N pH 4,0, sin que se eluyera así nada de proteína. Seguidamente, se eluyó el anticuerpo con el tampón de glicina-HCl, 0,1N, pH 1,5, y se recogieron

fracciones de 3 ml a la temperatura ambiente en tubos que contenían 1 ml de tampón de borato 1 N, pH 9,0. Casi todo el anticuerpo fue recogido en tres fracciones, que se combinaron y dializaron durante 24 horas, frente a tampón de fosfato 0,1N, pH 7,5 (2x2000 ml). La actividad de antimorfina de la fracción aislada se determinó con marcado por espín de morfina y respondía al 70% de la actividad de antimorfina inicialmente combinada. Esta fracción era 100% pura, como se determinó por el valor del título de la actividad de antimorfina comparada con el contenido de proteínas estimado a partir del espectro ultravioleta a 280 nm.

B. (a) Purificación de anticuerpo de morfina por cromatografía con Sephadex.

La solución de IgG(m) de antimorfina (2 ml, aproximadamente 50 mg/ml de proteína total) se separó en columna Sephadex G-200 (2 x 30 cm) con solución salina tamponada con fosfato 0,01M (PBS), pH 7,4 (caudal 1 ml/10 minutos). La IgG se separó claramente de la IgM y se recogieron albúmina y fracciones de 2-3 ml. La IgG obtenida no mostró nada de albúmina por electroforesis con acetato de celulosa (tampón tris-barb., pH 8,8, $\eta = 0,1$) y era IgG con 32 a 35% de riqueza de antimorfina. La recuperación dependía de la anchura de la sección del máximo IgG recogido y era usualmente del

50% de la actividad de antimorfina total aplicada a la columna. La fracción de IgG recogida se dializó frente a tampón de fosfato 0,01 M, pH 7,5.

(b) Tratamiento inmunoadsorbente de la albúmina de suero bovino (BSA)

Se copuló BSA con Sepharose 4B (Pharmacia) activada con CNBr, de acuerdo con las instrucciones de la compañía (se utilizó 50% de exceso de BSA sobre la cantidad recomendada). Cinco ml de la solución de IgG cromatografiada en Sephadex (20 mg/ml) se aplicaron a la columna de inmunoadsorbente-BSA (1 x 15 cm) y se pasó a través de ella con tampón de fosfato 0,01 M, pH 7,5. La proteína recogida salió en un volumen de 20 ml y fue sometida a ensayo para determinar el contenido de proteínas (uv) y la actividad de antimorfina (método de marcado por el spin). La recuperación de proteínas fue del 70% y la recuperación de actividad de antimorfina fue del 90 al 92%.

(c) Antimorfina (IgG(m)) marcada con TRITC (RIgG(m)).

A una solución de IgG(m) (7 mg/0,5 ml) en tampón de fosfato 0,01 M, pH 7,5, se añade carbonato potásico cristalino hasta pH 10,0-10,5 con agitación a la temperatura ambiente. Seguidamente, se añade TRITC (isotiocianato de tetrametilrodamina) (15-1000 microgramos) disuelto en acetona (3-30 microlitros) y se continúa agitando du-

rante 3 horas. Inicialmente el pH desciende a 9,0 y, seguidamente, permanece estable y se mantiene a 9,0-9,5 si es necesario, mediante la adición cuidadosa de carbonato potásico cristalino. La mezcla de reacción se aplica, seguidamente, a una columna de Sephadex G-25(M) (1 x 15 cm) con tampón de fosfato 0,01 M, pH 7,5, y la elución de la primera banda coloreada, que se separa completamente de las otras bandas, se recoge en el término de 10 a 15 minutos. La separación se repite dos veces con el fin de garantizar la eliminación completa del colorante libre. En el caso de la formación de un precipitado, se separa el precipitado por centrifugación, antes de la separación en la Sephadex. La siguiente tabla describe la preparación de conjugados con diversos grados de marcado mediante el procedimiento anterior:

Proteína (% de antimorfina)	Concentración mg/0,5 ml	Colorante (TRITC) microgramos	D/P* (M/M)	% de actividad recuperada
IgG (45)	7,1	15	0,9	86
IgG (45)	7,1	50	2,2	89
IgG (45)	7,1	150	4,4	75
IgG (45)	7,1	400	15-16	75
IgG (45)	7,1	750	20-23	70

* D/P colorante/proteína

EJEMPLO III. Isotiocianato de fluoresceína (FITC)-
-anticuerpo de morfina marcado (FITC(m)).

(a) Procedimiento de conjugación

Cuatro fracciones de 1 ml de anticuerpo de morfina cromatografiada por afinidad (3,06 mg proteína/ml) (véase Ejemplo II) en tampón de fosfato 0,01M, pH 7,5, se llevaron a pH 9,5 con carbonato sódico cristalino (Na_2CO_3). A las cuatro fracciones de anticuerpo se añadieron a la temperatura ambiente y con agitación, respectivamente, 10, 20, 30 y 50 microlitros de una solución en acetona de FITC (2 mg/300 microlitros). Al cabo de 3 horas, se combinaron las cuatro mezclas de reacción y, seguidamente, se dividieron en 8 porciones iguales, y se hizo pasar cada una de ellas a través de una columna Sephadex G-25 (1 x 15 cm) equilibrada con tampón de fosfato 0,01M, pH 7,5. La elución con el mismo tampón proporcionó (la primera banda coloreada) el conjugado, que estaba libre del colorante sin reaccionar.

(b) Separación de conjugado FITC sobre columna

DEAE-celulosa

(véase M. Goldman en "Fluorescent Antibody Methods", Academic Press ed., 1968, páginas 104 a 107). El conjugado de FITC antimorfina se aplicó a una columna DEAE-celulosa (1 x 3 cm) equilibrada con tampón de fosfato

0,01 M, pH 7,3. La elución con el mismo tampón con una concentración de NaCl creciente, proporcionó fracciones de contenido de colorante creciente. El contenido de colorante D/P de las diversas fracciones se determinó con el nomógrafo de Wells (A. F. Wells, C.E. Miller y M.K. Nadel, Appl. Microbiol, 14, 271 (1966)). La actividad de antimorfina se determinó de la manera usual con marcado por el spin de morfina. Se obtuvieron las siguientes fracciones:

<u>Fracción Nº</u>	<u>Proteína, mg</u>	<u>D/P, mol/mol</u>
1	1,75	1,5
2	1,3	3,0
3	1,15	6,0
4	1,42	9,0

EJEMPLO IV. Purificación de anticuerpo para gamma-globulina humana (IgG(hIgG)) y conjugación con FITC (FIgG(hIgG)) y TRITC (RIgG(hIgG)).

(a) Purificación de anticuerpo para IgG humana por cromatografía por afinidad.

Sepharose-4B (2 g) se copuló con 18 mg de gamma-globulina humana (hIgG) como se describe en el manual de la compañía (Pharmacia Upsala), Antisuero de conejo (50 ml) para hIgG (5 mg anticuerpo/ml) (IgG(hIgG)) se obtuvo de

Antibodies Incorporated. Se preparó una columna (1 x 3 cm) del conjugado anterior de Sepharose-hIgG con tampón de borato 0,01 M, pH 8,0. El antisuero se hizo pasar por la columna, lavándose después con el mismo tampón hasta que no se pudo detectar nada de proteínas en el eluyente. La columna se lavó seguidamente con tampón de glicina HCl, 0,1 M, pH 5,0. Seguidamente, se eluyó el anticuerpo con tampón de glicina HCl, 0,1M pH 2,5; se recogieron fracciones de 3 ml e inmediatamente se neutralizaron con tampón de borato 0,5 M, pH 9,0. El volumen total de solución de anticuerpo así recogido era de 30 ml. La solución de anticuerpos se dializó durante la noche frente a tampón de fosfato 0,05 M, pH 8,0, seguidamente se concentró con Aquacide y se dializó de nuevo. El volumen final era de 11 ml y el contenido de proteína-anticuerpo de 3,76 mg/ml, según se determinó por el espectro de absorción para 280 nm. El anticuerpo recogido fue 83%.

(b) Preparación de FIGG (hIgG).

(i) La solución de anticuerpo anterior (1 ml) en tampón de fosfato 0,05 M, pH 8,0, se llevó a pH 9,5 con Na_2CO_3 cristalino. Se añadió a la temperatura ambiente, FITC (100 microgramos) en 10 microlitros de acetona y se agitó durante 3 horas. El conjugado se separó seguidamente en Sephadex G-25 (M) (1x10cm) equilibrada con tampón de fosfato 0,05 M, pH 8,0. El conjugado se recogió

en 1,5 ml; tenía un D/P = 4,3 (M/M) (colorante/proteína) y 2,05 mg/ml, según se determinó por el nomógrafo de Wells.

(c) Preparación de RIgG(hIgG)

(i) La solución de anticuerpo anteriormente descrita (1 ml) en tampón de fosfato 0,05 M, pH 8,0 se llevó a pH 9,5 con Na_2CO_3 cristalino. Se añadió a la temperatura ambiente, TRITC (0,5 mg) en acetona (20-30 microlitros) y la mezcla se agitó durante 3 horas. Un precipitado que se formó, se separó por centrifugación y se desechó. Seguidamente, se separó el conjugado por dos veces en columna de Sephadex G-25 (1x10 cm) equilibrada con tampón de fosfato 0,05 M, pH 8,0. El producto se recuperó en un volumen de 2 ml y tenía un D/P = 10 y 0,7 mg/ml, como se determinó por el espectro de absorción a 280 y 516 nm.

(ii) Se obtuvo de Antibodies Inc., una fracción de IgG separada en DEAE-celulosa (27,6 mg/ml) de antisero de conejo para hIgG (6,4 mg anticuerpo/ml). La anterior solución de proteína (0,5 ml) se llevó a pH 9,5 con Na_2CO_3 cristalino, y se añadieron, con agitación, en frío (4°) 3 mg de TRITC en 50 microlitros de acetona + 0,5 ml de H_2O . Al cabo de 3 horas, se produjo un precipitado que se separó por filtración. La solución violeta resultante se separó sucesivamente, por dos veces,

en columna de Sephadex G-25(M) (2 x 30 cm) equilibrada con tampón de fosfato 0,05M, pH 8,0. El conjugado resultante era 0,1 mg de anticuerpo/ml y tenía un D/P = 12-15 (M/M) según se calculó a partir del espectro de absorción.

EJEMPLO V.- Conjugación de gamma-globulina humana (hIgG) con fluoresceína. (FhIgG)

Un miligramo de HIgG (IgG humana) disuelto en 0,4 ml de tampón de fosfato 0,1 M, pH 7,5, se llevó a pH 9,5 con Na₂CO₃ cristalino. Una solución (10 microlitros) de FITC (70 microgramos) en acetona se añadió con agitación, y se mezcló durante 3 horas a la temperatura ambiente. La solución resultante se separó por dos veces, en columna de Sephadex G-25 (M) (1x15 cm) equilibrada con tampón de fosfato 0,05 M, pH 8,0. La solución conjugada de FITC-hIgG eluida, era de una concentración de 0,58 mg/ml y tenía un D/P = 5,5 (M/M) según se determinó por el nomógrafo de Wells.

EJEMPLO VI.- Morfina conjugada con albúmina de suero bovino (BSA-44m).

O³-carboximetil morfina (3,43 g) y 1,31 ml de cloroformiato de isobutilo se combinaron en 30 ml de dimetilformamida a 0°C. La solución transparente resultante se

añadió, seguidamente, a una solución en agitación de 2,88 g de albúmina de suero bovino y 13 g de NaHCO_3 en 600 ml de agua, a 0°. La adición se realizó por medio de una jeringa con su punta situada por debajo de la su perficie de la solución. La solución se agitó en una habitación fría durante la noche.

Después de hacer pasar la solución a través de una columna de Sephadex grande, se concentró el efluente hasta 60 ml con Dow HFD/l durante la noche y se liofili zó para obtener 3,1 g. Mediante análisis ultravioleta se demostró que el producto tenía un promedio de aproxim adamente 44 grupos de morfina.

Con el fin de demostrar la eficacia de los ensayos del presente invento, utilizando la extinción de la fluo rescencia como método de medir la presencia de un ligan do, se efectuaron varios ensayos diferentes, empleando diferentes métodos o recetas.

El primer ensayo a considerar es el ensayo para la morfina y la codeína, empleando el isotiocianato de fluoresceína conjugado con O^3 -aminoetilmorfina (FLUMO'S').

Como primera parte de este ensayo, se combinaron varios conjugados de anticuerpo que tenían diversos gra dos de marcado de rodamina, con FLUMO'S' para determi- nar la extinción máxima.

El FLUMO'S' estaba en una concentración de 1,83

$\times 10^{-9}$ M en tampón de borato 0,05M, pH 8,0. Se registró la intensidad relativa de la fluorescencia para $F_{\text{max}} = 516-518$ nm, por exploración desde 490 nm a 530 nm, la línea de excitación era 462-464 nm y las ranuras se ajustaron con un botón de sensibilidad para mantener el máximo a escala con un espectrofotómetro de fluorescencia Perkin-Elmer, modelo MPF-2A. La celda del espectrofotómetro, 1 cm de longitud de trayectoria (3 ml en volumen), se instaló en una base de combinación de dos espejos. El anticuerpo conjugado se dejó incubarse con FLUMO'S' a la temperatura ambiente en viales de pirex, durante 30 a 40 minutos, antes de tomar la lectura de la fluorescencia.

La proporción de colorante/proteína (D/P) (M/M) para los conjugados fue de 0,9, 2,2, 4,4, 15 a 16 y 20 a 22. Los resultados que indicaban eficacia relativa (1/2 de la extinción máxima en % dividido por el número correspondiente de equivalentes de puntos de unión) fueron respectivamente 6, 16,4, 24, 51,4 y 31,5.

Al realizar el ensayo, se emplearon los siguientes reactivos: FLUMO'S'- $1,38 \times 10^{-7}$ M; RIGG(m) D/P 30, $4,58 \times 10^{-7}$ M; tampón de borato 0,05 M, pH 8,0; soluciones de morfina patrón ($1,5 \times 10^{-3}$ - $1,5 \times 10^{-7}$ M). La incubación se efectuó en tubos de vidrio.

Procedimiento: Se diluyeron cantidades iguales

de RIgG(m) (40 microlitros) con tampón de borato 0,05 M, pH 8,0 (2940-2990 microlitros) y se incubaron a la temperatura ambiente, con cantidades crecientes de morfina (5-10 microlitros de las soluciones de morfina patrón) durante una hora. Seguidamente, se añadió FLUMO'S' (10 microlitros) y la mezcla se incubó durante una hora más. El volumen final de cada tubo era de 3 ml. La concentración final de FLUMO'S' fue de $4,6 \times 10^{-10}$ M y la de RIgG(m) de $6,1 \times 10^{-9}$ M en los puntos de unión. Los resultados se indican en la siguiente tabla como aumento de la intensidad de la fluorescencia en forma de porcentaje de la fluorescencia máxima posible (FLUMO'S' sin anticuerpo de extinción).

TABLA I

<u>Morfina (molaridad)</u>	<u>Intensidad de señal</u>	<u>% de F_{max}</u>
0	27	33,33
$2,5 \times 10^{-9}$	28	34,5
5×10^{-9}	29,5	36,4
$2,5 \times 10^{-8}$	35	43,2
5×10^{-8}	38	46,9
$2,5 \times 10^{-7}$	54	66,6
5×10^{-7}	60	74

continúa...

...continuación Tabla I)

	<u>Morfina (molaridad)</u>	<u>Intensidad de señal</u>	<u>% de F_{max}</u>
5	2,5x10 ⁻⁶	74	91,3
	5x10 ⁻⁶	78	96,3

El estudio se repitió a excepción de que se empleó codeína en lugar de morfina. La siguiente tabla indica los resultados:

TABLA II

	<u>Codeína (molaridad)</u>	<u>Intensidad de señal</u>	<u>% de F_{max}</u>
15	0	27	32,9
	2,5x10 ⁻⁹	30,5	37,2
	5x10 ⁻⁹	36	43,9
	2,5x10 ⁻⁸	51	62,2
20	5x10 ⁻⁸	58	70,7
	5x10 ⁻⁷	75	91,5
	2,5x10 ⁻⁶	80	97,5

Se repitió el ensayo, pero en lugar del anticuerpo de morfina marcado con rodamina (RIGG(m)) que tenía una

relación D/P (colorante/proteína) (M/M) de 30, se empleó RIgG(m) que tenía una relación D/P de 22. Lo que sigue son los resultados empleando morfina.

TABLA III

<u>Morfina (molaridad)</u>	<u>Intensidad de señal</u>	<u>% de F_{max}</u>
0	24,5	29,9
$2,5 \times 10^{-10}$	26,0	31,7
5×10^{-10}	26,5	32,3
$2,5 \times 10^{-9}$	28,0	34,1
5×10^{-9}	29,0	35,4
1×10^{-8}	33,5	40,8
$2,5 \times 10^{-8}$	40,0	48,8
5×10^{-8}	45,5	55,5
1×10^{-7}	53,0	64,6
$2,5 \times 10^{-7}$	63,0	76,8
5×10^{-7}	68,0	82,9
1×10^{-6}	72,5	88,4
$2,5 \times 10^{-6}$	80,0	97,5
5×10^{-6}	82,0	100

El siguiente estudio que se realizó, empleó un poli ligando a saber morfina conjugada con albúmina de suero

bovino, que tenía un número medio de 44 grupos de morfina por albúmina. En un primer ensayo, se empleó el poliligando como una proteína sintética en la que el poliligando tiene una pluralidad de puntos epitópicos de morfina. En una segunda serie de ensayos, se empleó el poliligando en un ensayo para determinar morfina o codeína. En ambos ensayos, ningún cromóforo está unido covalentemente al punto epitópico de interés, sino que más bien cada uno de ellos resultó unido a través del anticuerpo. Así, existe una unión al azar de anticuerpo a morfina en el poliligando. Para las concentraciones de interés, en un estudio no descrito aquí, se encontró que se obtenía la extinción óptima cuando había una proporción de extinguidor, como receptor-extinguidor, a fluorescedor, como receptor-fluorescedor, de aproximadamente 5 a 1.

En el primer ensayo, que es un ensayo para el poliligando (análogo del ligando), se prepararon una serie de tubos que contenían, cada uno de ellos, $6,4 \times 10^{-9} M$ (en los puntos de unión) de antimorfina, que tenía una proporción D/P de fluoresceína/anticuerpo de 9, y $3,47 \times 10^{-8} M$ (en los puntos de unión) de antimorfina que tenía una proporción D/P de rodamina/anticuerpo de aproximadamente 22 en tampón de fosfato 0,05 M, pH 8,0, que contenía gamma-globulina bovina $1,2 \times 10^{-6} M$. Diversas cantidades de la morfina conjugada con la albúmina de suero

bovino (aproximadamente 44 grupos de morfina para albúmina) (0,012-1,2 microgramos) se añadieron (en 5-10 microlitros) a cada uno de los tubos, de tal modo que el volumen final era de 0,5 ml, y se incubaron a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Seguidamente, se mide la fluorescencia de cada uno de los tubos y se expresa en porcentaje de fluorescencia máxima posible (cuando no hay presente morfina conjugada con albúmina de suero bovino). Los resultados se dan en la siguiente tabla.

TABLA IV

44m-BSA, microgramos (añadidos)	% de F_{max}
0	100
0,012	84,5
0,024	72
0,048	64,5
0,084	61
0,12	66
0,24	74
0,48	83
1,20	92

Para determinar la codefina, se empleó el siguiente

procedimiento: empleando la misma antimorfina-fluoresceína (FIgG(m)) y antimorfina-rodamina (RIgG(m)) que se ha empleado anteriormente, se diluyeron 30 microlitros del FIgG(m) ($2,64 \times 10^{-7} M$) y 30 microlitros del RIgG(m) ($1,44 \times 10^{-6} M$): en una serie de tubos con tampón de fosfato 0,05 M, pH 8,0, que contenían $1,5 \times 10^{-6} M$ de gamma-globulina bovina (390-430 microlitros). Seguidamente, se añade codeína (10 a 40 microlitros) en concentraciones crecientes ($1,5 \times 10^{-3}$ a $1,5 \times 10^{-6} M$) y la mezcla se incubaba a la temperatura ambiente durante 0,5 horas. A cada uno de los tubos se añaden, seguidamente, 10 microlitros (0,24 microgramos) del conjugado de morfina-albúmina de suero bovino utilizado previamente, y los tubos se incuban durante una hora más. El volumen final de cada tubo era de 0,5 ml. Seguidamente se registró la fluorescencia de cada uno de los tubos a 518 nm y se expresó como porcentaje de fluorescencia máxima posible (cuando no hay presente conjugado de morfina-BSA). La siguiente tabla indica los resultados:

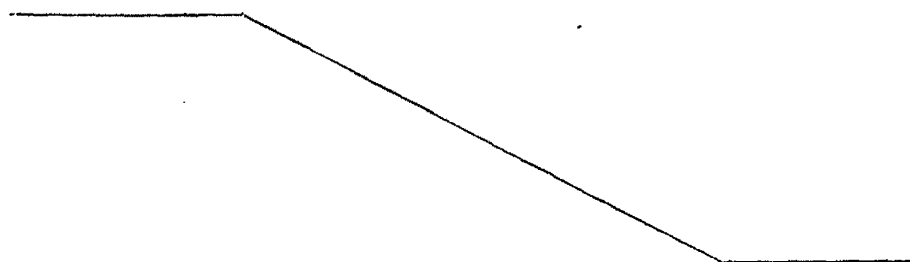


TABLA V

Codefina (M)	% de F _{max}
0	49
3×10^{-9}	51
6×10^{-9}	54
$1,2 \times 10^{-8}$	56,5
3×10^{-8}	62
6×10^{-8}	70,5
$1,2 \times 10^{-7}$	81
3×10^{-7}	90,5
6×10^{-7}	94,5
$1,2 \times 10^{-6}$	100
3×10^{-6}	100

Los siguientes dos estudios implican la proteína natural gamma-globulina humana, en el primer estudio, se empleó gamma-globulina humana-fluoresceína (PhIgG) D/P 5,5, para la determinación de gamma globulina humana. Se prepararon una serie de tubos, conteniendo cada uno de ellos 100 microlitros de 0,017 miligramos/ml de con jugado de anti(gamma-globulina humana-rodamina) (RIgG (hIgG), D/P 12-15, en tampón de fosfato 0,05M, pH 8,0 (330-380 microlitros) que contenían albúmina de suero bovino (0,6 mg/ml). Seguidamente, se añadieron canti-

dades crecientes de gamma-globulina humana (en 15-35 microlitros) y se incubaron durante 30 minutos a la temperatura ambiente. A las soluciones se añadieron, seguidamente, 30 microlitros de 0,014 mg/ml de PhIgG. El volumen final, en cada caso, fue de 0,5 ml. La concentración final del PhIgG era de $5,4 \times 10^{-9} M$, mientras que las concentraciones de gamma-globulina humana estaban comprendidas en el margen de $4,84 \times 10^{-10}$ a $6,45 \times 10^{-8} M$. Después de un segundo periodo de incubación de 30 minutos, se registró la fluorescencia de los tubos a 522 nm, como porcentaje de fluorescencia máxima posible. La siguiente tabla indica los resultados.

TABLA VI

<u>HIgG (M)</u>	<u>% de F_{max}</u>
0	28
$4,84 \times 10^{-10}$	33
$8,06 \times 10^{-10}$	36
$1,13 \times 10^{-9}$	38
$1,61 \times 10^{-9}$	46
$3,22 \times 10^{-9}$	68
$4,84 \times 10^{-9}$	81
$8,06 \times 10^{-9}$	91
$1,13 \times 10^{-8}$	93

continúa...

continuación Tabla VI

<u>HIgG (M)</u>	<u>% de F_{max}</u>
1,61x10 ⁻⁸	95,5
3,22x10 ⁻⁸	96
6,45x10 ⁻⁸	98

En la siguiente determinación, se ensayó la gamma-globulina humana, empleando conjugado de anti(gamma-globulina humana-fluoresceína) (FIgG(hIgG)) y conjugado de anti(gamma-globulina humana-rodamina) (RIgG(hIgG)). El conjugado de fluoresceína tenía una relación D/P de 4,3 y el conjugado de rodamina tenía una relación D/P de 10. Todos los reactivos fueron diluidos con tampón de fosfato 0,05 M, pH 8,0, que contenían 0,6 mg/ml de albúmina de suero bovino. Se prepararon una serie de tubos, con teniendo cada uno de ellos 400 microlitros del tampón indicado. A cada uno de los tubos se añadieron 30 microlitros de 2,7 microgramos/ml de FIgD(hIgG) y 30 microlitros de 35 microgramos/ml de RIgG(hIgG). Los tubos se mezclaron y se añadieron cantidades crecientes de gamma-globulina humana en soluciones de 40 microlitros, y se incubaron a la temperatura ambiente durante una hora. Seguidamente, se midió la fluorescencia de los tubos y se expresó como porcentaje de fluorescencia total

en ausencia de gamma-globulina humana. La siguiente tabla indica los resultados:

TABLA VII

IgG humana (M)	% de F _{max}
3×10^{-11}	100
6×10^{-11}	95,7
$1,2 \times 10^{-10}$	93,2
$1,8 \times 10^{-10}$	89,5
$2,4 \times 10^{-10}$	86,5
3×10^{-10}	82,2
6×10^{-10}	70,5
$1,2 \times 10^{-9}$	60,7
$1,8 \times 10^{-9}$	62
$2,4 \times 10^{-9}$	68,1
3×10^{-9}	69,3
6×10^{-9}	79
$1,2 \times 10^{-8}$	87,7
$1,8 \times 10^{-8}$	88,3
$2,4 \times 10^{-8}$	93,8

Como se pone en evidencia por la anterior Tabla VII, con una concentración creciente de gamma-globulina humana, la fluorescencia disminuye hasta un mínimo y seguida

mente aumenta. Por lo tanto, con una sustancia desconocida, sería necesario realizar dos diluciones para determinar qué parte de la curva estaba implicada.

Los resultados anteriores demuestran la extrema sensibilidad y amplio margen de posibilidades de los ensayos del presente invento. Empleando el fenómeno de fluorescencia-extinción, se pueden ensayar directamente una amplia variedad de diferentes compuestos, tanto hapténicos como antigénicos. Se pueden emplear reactivos en los que el hapteno o el antígeno están unidos covalentemente al cromóforo o alternativamente, en los que el compuesto de interés tiene una pluralidad de puntos epitópicos, pudiéndose emplear mezclas de anticuerpos con una porción de los anticuerpos unidos al extinguidor y con una porción de los anticuerpos unidos al fluorescedor. En esta situación, no se necesitan derivados del ligando para la preparación de reactivos, cuando se dispone de un receptor de origen natural o cuando el ligando es antigénico.

Además, se pueden preparar reactivos que tengan una pluralidad de moléculas hapténicas o antigénicas unidas a una molécula núcleo. La molécula núcleo puede estar unida a un cromóforo y al anticuerpo empleado, que está conjugado con el otro miembro del par fluorescedor-extinguidor, o bien se puede emplear la mezcla de anticuerpos

indicada anteriormente. El ensayo es relativamente rápido y, dependiendo de las concentraciones, se necesitan diversos tiempos de incubación. Además, se pueden emplear fluorímetros convencionales, que son relativamente baratos y de fácil lectura.

Aunque la invención precedente ha sido descrita con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo, con fines de claridad de entendimiento, será evidente que se pueden efectuar ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas:

REIVINDICACIONES

1ª.- Un método para determinar en una solución de ensayo la presencia de un ligando en una sustancia des conocida que se sospecha que contiene dicho ligando, te niendo dicho ligando por lo menos un punto epitópico, en el que dos cromóforos, Ch_1 y Ch_2 , que forman un par flu rescedor-extinguidor, se emplean como reactivos, con lo que en dicha solución de ensayo, la cantidad de flu rescedor que está dentro de la distancia de extinción de dicho extinguidor, es afectada por la presencia del li gando, que comprende: (A) combinar en un medio tamponado acuoso, para formar una solución de ensayo (1) dicha sus tancia desconocida, (2) una fuente de Ch_1 , como Ch_1 unido covalentemente a una primera composición receptora ca paz de unirse de modo no covalente y específicamente a dicho ligando, (3) una fuente de Ch_2 , como Ch_2 unido covalentemente a una segunda composición receptora ca paz de unirse de modo no covalente y específicamente a dicho ligando, o como Ch_2 unido covalentemente o no covalentemente a un análogo del ligando, en el que el aná logo del ligando es un radical monovalente o polivalente, una proporción sustancial del cual define uno o más

puntos epitópicos capaces de competir con el ligando por los puntos de unión de dicho receptor; (B) incubar dicha solución de ensayo durante un tiempo suficiente para que, por lo menos una porción de dichas composiciones receptoras se combinen con por lo menos una porción de cualquier ligando que esté presente; (C) irradiar dicha solución de ensayo incubada con luz de una longitud de onda dentro del espectro de absorción de dicho fluoroscador; y (D) medir la cantidad de fluorescencia procedente de dicha solución de ensayo, en comparación con una solución de ensayo que tiene una cantidad conocida de ligando.

2ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que dichas composiciones receptoras 1ª y 2ª son el mismo antiligando.

3ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª en el que dicha primera composición receptora es una combinación de antiligando procedente de una primera especie, y de anti(antiligando primero) conjugado con CH_1 , y dicha segunda composición receptora es antiligando procedente de una segunda especie y anti(antiligando segundo) conjugado con Ch_2 .

4ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que dicho ligando tiene un peso molecular comprendido entre aproximadamente 110 a 2.000.

5ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que dicho ligando es un poli(aminoácido) que tiene una pluralidad de puntos epitópicos y un peso molecular de por lo menos aproximadamente 10.000.

6ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que dicho ligando es de un peso molecular mayor de aproximadamente 2.000 y tiene una pluralidad de puntos epitópicos y dichas fuentes de Ch_1 y Ch_2 son dichas primera y segundas composiciones receptoras unidas covalentemente a Ch_1 y Ch_2 respectivamente.

7ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 6ª, en el que dicho ligando es una proteína de suero.

8ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 7ª, en el que dicha proteína de suero es una globulina.

9ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 7ª, en el que dicha proteína de suero es una albúmina.

10ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 7ª, en el que dicha proteína de suero es una lipoproteína.

11ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 7ª, en el que dicha proteína de suero es una glicoproteína.

12ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 7ª, en el que dicha proteína de suero es un factor de complemento.

13ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 7ª, en el que dicha proteína de suero es un factor coagulan-

te de la sangre.

14ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 6ª, en el que dicho ligando es por lo menos una porción de un microorganismo.

5 15ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 14ª, en el que dicho ligando es una porción de la membrana del microorganismo.

16ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 14ª, en el que dicho microorganismo es un virus.

10 17ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 6ª, en el que dicho ligando es un poli(aminoácido) de un peso molecular mayor de aproximadamente 10.000.

15 18ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que dicho ligando es una asociación de un antígeno y un anticuerpo para dicho antígeno.

19ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que dichas composiciones receptoras son anticuerpos, dicho medio acuoso tiene de 0 a 20% en volumen de un disolvente orgánico polar inerte, dicho medio acuoso está tamponado en el margen de desde aproximadamente 5 a 10, la cantidad de receptor añadida es suficiente para proporcionar desde aproximadamente 20 a 80% de extinción, y la solución de ensayo se incubaba a una temperatura en el margen de aproximadamente 0 a 45°C.

25 20ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª,

en el que dicha fuente de Ch_2 es: análogo de ligando-
- $(\text{Ch}_2)_x$; poli (análogo de ligando)-poli (Ch_2) ; poli(aná-
logo de ligando) y receptor- Ch_2 , en el que poli(análogo
de ligando) tiene una pluralidad de análogos de ligando
5 unidos covalentemente a una molécula núcleo polifunciona-
lizada; o, cuando dicho ligando tiene una pluralidad de
puntos epitópicos, receptor- Ch_2 .

21ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación
20ª, en el que dicho ligando es de un peso molecular
10 comprendido entre aproximadamente 110 y 2.000, y dicho
receptor es un anticuerpo.

22ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación
20ª, en el que dicho ligando es un poli(aminoácido) que
tiene una pluralidad de puntos epitópicos y que tiene un
15 peso molecular de por lo menos aproximadamente 10.000.

23ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación
20ª, en el que dicho ligando es de un peso molecular ma-
yor de aproximadamente 2.000 y tiene una pluralidad de
puntos epitópicos, dicho receptor es un anticuerpo, y
20 dicha fuente de Ch_2 es receptor- Ch_2 .

24ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª,
en el que dicho medio tamponado acuoso está a un pH en
el intervalo de aproximadamente 5-10, dicha fuente de
 Ch_2 es análogo de ligando- Ch_2 ; y las concentraciones de
25 receptor- Ch_1 y análogo de ligando- CH_2 proporciona desde

aproximadamente 20-80% de la extinción de la fluorescencia en ausencia del ligando.

5 25ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 24ª, en el que dicho ligando es de un peso molecular de aproximadamente 110 a 2.000 y es una droga que tiene un anillo bencénico separado de un grupo amino por 2 a 3 átomos de carbono alifáticos.

26ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 24ª, en el que dicho ligando es un esteroide.

10 27ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en donde dicha fuente de Ch_2 es receptor- Ch_2 ; dicho medio acuoso tamponado está a un pH en el intervalo de aproximadamente 5-10 y dicha incubación ocurre a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 0-45°C.

15 28ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 27ª, en el que dicho ligando es un poli(aminoácido) de por lo menos un peso molecular de aproximadamente 10.000.

20 29ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que dicho medio tamponado acuoso está a un pH en el intervalo de aproximadamente 5-10 y dicha fuente de Ch_2 es poli(análogo de ligando) y receptor- Ch_2 , en donde el análogo de ligando es un radical monovalente o polivalente, del cual una proporción sustancial define uno o más puntos epitópicos capaces de competir con el ligando para los puntos de fijación de dicho receptor y el poli(aná

25

logo de ligando) tiene una pluralidad de análogos de ligando unidos covalentemente a una molécula núcleo polifuncionalizada; y la incubación tiene lugar a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 0-45°C.

5 30ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 29ª, en el que dicho ligando tiene un punto epitópico y es de un peso molecular comprendido en el margen de aproximadamente 110 a 2.000.

10 31ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 30ª, en el que dicho ligando es una droga que tiene un anillo bencénico separado por 2 a 3 átomos de carbono alifáticos, de un grupo amino.

 32ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 30ª, en el que dicho ligando es un esteroide.

15 33ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 29ª, en el que dicha molécula núcleo polifuncional, es un poli(aminoácido) de un peso molecular de por lo menos 30.000.

20 34ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que dicha fuente de Ch_1 es a-(anti-ligando) y anti(a-anti-ligando)- Ch_1 y dicha fuente de Ch_2 es b-(anti-ligando) y anti(b-anti-ligando)- Ch_2 , en donde a y b designan una fuente de especies diferentes para el anti-ligando.

25 35ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª,

5 en el que dicho componente desconocido es anti-ligando,
el ligando es incluido en la etapa (A); y la etapa (D)
la cantidad de fluorescencia se compara con una solución
de ensayo que tiene una cantidad conocida de anti-ligando.

36ª.- UN MÉTODO PARA DETERMINAR EN UNA SOLUCION DE
ENSAYO LA PRESENCIA DE UN LIGANDO.

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

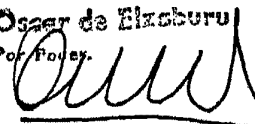
10 Esta Memoria consta de noventa y siete hojas escritas
a máquina por una sola cara.

Madrid,

01.SET.1976

15 P.A.

Oscar de Elzburu
Por Poder.



20

25

9-8-76
MPB.-

- 97 -