

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA  
Registro de la Propiedad Industrial



20 DIC. 1978

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

(19) ES	(11) NUMERO	(10) A1
(21)	471.585	
(22)	FECHA DE PRESENTACION	
	10.7.78	

PATENTE DE INVENCION

ESPAÑA

A1 471 585 790116 G01N 33/16

(30) PRIORIDADES:		
(31) NUMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
P 27 31 992.2	15.7.77	Rep. Fed. Al.
P 28 18 739.5	28.4.78	
(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVINORARIA
	G01N	
(24) TITULO DE LA INVENCION		
"PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION DE REACTIVOS Fc"		
(71) SOLICITANTE (S)		
BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
D-3550 Marburg/Lahn, República Federal Alemana		
(72) INVENTOR (ES)		
Dr. Hans Harald Sedlacek y Dr. Friedrich Robert Seiler		
(73) TITULAR (ES)		
(74) REPRESENTANTE		
D. ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ		(P.- 68.608)

1 La invención se refiere en primer lugar a un pro-  
ducto de desdoblamiento de una inmunoglobulina con parte  
Fc inmunológicamente intacta, que está unida adhesiva o  
químicamente a un soporte. Además la invención se refiere  
5 a un procedimiento de análisis inmunológico para la deter-  
minación de reactivos - Fc en soluciones acuosas sobre to-  
do en líquidos corporales tales como plasma o suero. Se re-  
fiere especialmente a la determinación de los reactivos Fc,  
factor de reuma y factores de complemento C1<sub>q</sub> y C3<sub>d</sub>.

10 Además la invención se refiere a un procedimien-  
to para la determinación de inmunoglobulina modificada in-  
munológicamente, especialmente de los llamados inmunocom-  
plejos. Estos son complejos que se forman mediante reacción  
de un antígeno con un anticuerpo. Se refiere en primer lu-  
15 gar a un procedimiento para la determinación de los immuno-  
complejos en un líquido corporal. Dado que los aglomerados  
de anticuerpos y productos de desdoblamiento de anticuer-  
pos, debido a la modificación de la inmunoglobulina, se com-  
portan de manera similar a los inmunocomplejos, el procedi-  
20 miento puede extenderse a su determinación.

Es sabido que la determinación de anticuerpos, de  
complejos de anticuerpos y antígenos y de antígenos en lí-  
quidos biológicos, especialmente líquidos corporales tales  
como orina o suero proporciona indicaciones importantes al  
25 diagnóstico y para la terapia de diferentes enfermedades,  
especialmente de enfermedades infecciosas, enfermedades cau-  
sadas por tumores o desviaciones inmunológicas. Existe por  
tanto una necesidad de un procedimiento exacto y de fácil  
realización para la comprobación y para la determinación de  
30 inmunocomplejos.

1                    Son conocidos ya procedimientos para la detec-  
ción de complejos de anticuerpos y antígenos o de aglome-  
rados de anticuerpos. Como base de los procedimientos co-  
nocidos está el conocimiento de que tanto el factor de reu-  
5                    ma (RF) como también el componente  $C1_q$  del sistema de com-  
plejos (los llamados reactivos Fc) tienen la propiedad de  
acumularse en partes Fc de inmunoglobulinas, que están uni-  
das con un antígeno o entre sí. Por ello, o el  $C1_q$  o el RF  
eran provistos con un agente de marcación o se empleaba la  
10                    precipitación de complejos de antígenos y anticuerpos con  
una de las proteínas de ensayo implicadas o la aglutinación  
de partículas de látex recubiertas con inmunoglobulina, o  
de eritrocitos recubiertos con inmunoglobulina por medio de  
RF o  $C1_q$  y su inhibición por medio de complejos de antígenos  
15                    y anticuerpos para la determinación.

                    Es sabido también que el factor de reuma es re-  
presentado por autoanticuerpos, que están dirigidos contra  
las inmunoglobulinas homólogas. La detección es de gran im-  
portancia para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades  
20                    reumáticas.

                    La determinación de factores de complemento, so-  
bre todo de  $C1_q$  y  $C3_d$  tienen su importancia en el caso de  
enfermedades inflamatorias, especialmente en enfermedades  
autoinmunes o con inmunocomplejos. Una disminución es de-  
25                    bida a un consumo elevado, y un aumento es debido a una  
formación intensificada de los factores.

                    Era sabido, finalmente que los factores de reuma  
pueden pertenecer a las diversas clases de inmunoglobulinas.  
La detección se realizaba hasta ahora con inmunoglobulinas  
desnaturalizadas, fijadas a inmunocomplejos o fijadas por  
30

1 adsorción a superficies por procedimientos de aglutinación  
o por la llamada técnica de fijación a anticuerpos dobles  
empleando un segundo anticuerpo dirigido contra el factor  
de reuma como primer anticuerpo, provisto con un agente de  
5 marcación (véase Knees, Reimer, J. Immunol. Methods 1977,  
18, 105-121; Hettenkofer y Müller, Arztl. Lab., 1975, 21,  
174-181; Johnson y Faulk, Clin. Imm. Immunopathol. 1976,  
6, 414-430).

10 El inconveniente de estos métodos de aglutinación  
consiste en que con ellos sólo pueden detectarse factores  
de reuma de la clase IgM, y en que no era posible  
establecer una diferenciación entre factores de reuma, los  
que son capaces de reaccionar con la parte Fab<sub>2</sub> de inmunoglobulinas  
y los que son capaces de reaccionar con la parte Fc  
15 y en que aparecieron resultados erróneamente positivos  
por medio de las seroproteínas, que son capaces de reaccionar  
con la parte Fc de inmunoglobulinas. Esto es conocido  
por ejemplo del C1<sub>q</sub> del sistema de complemento.

20 El inconveniente de los métodos de fijación a anticuerpos  
dobles realizados hasta ahora consiste en que en virtud de  
reacciones cruzadas están limitados o bien a la detección  
de factores de reuma de la clase IgM o IgA, si IgG humano  
está fijado como antígeno al soporte, o en que, si en lugar  
de IgG humano se emplean como antígeno inmunoglobulinas  
de otra especie, por ejemplo de conejo, sólo  
25 pueden detectarse factores de reuma que reaccionan de forma  
cruzada.

Se ha descrito además que para el diagnóstico de la  
artritis reumática es importante la porción del factor  
de reuma que reacciona con la parte Fc de inmunoglobulinas.

1 Se ha descrito también ya que la reacción del factor de  
reuma con la parte Fc de la inmunoglobulina sólo tiene lu-  
gar si la inmunoglobulina correspondiente, en la parte Fc,  
por fijación al antígeno o mediante adsorción a un soporte  
5 o mediante desnaturalización, ha experimentado una modifica-  
ción estérica (Gell, Coombs, Lachmann, Clinical Aspects of  
Immunology, 3ª edición, Blackwell 1975).

Determinaciones de  $C1_q$  o de  $C3d$  se efectuaron  
hasta ahora en métodos de precipitación empleando anticuer-  
10 pos dirigidos específicamente contra  $C1_q$  y  $C3d$ . De  $C1_q$  y  
 $C3d$  es sabido que ambos se fijan a la parte Fc de immuno-  
globulina, si la inmunoglobulina correspondiente ha expe-  
rimentado una modificación estérica mediante fijación a su  
antígeno, a un soporte o mediante desnaturalización (por  
15 ejemplo aglomeración en caliente).

Se ha hallado ahora sorprendentemente que tanto  
factores de reuma como también factores de complemento, ta-  
les como por ejemplo  $C1_q$ , se fijan al producto de desdobra-  
miento aislado de la molécula de inmunoglobulina, el llama-  
do fragmento Fc de IgG, con lo cual pueden superarse los  
20 inconvenientes mencionados anteriormente, tal como apare-  
cen en el caso de emplearse inmunoglobulinas.

Uno de los objetos de la invención es por consi-  
guiente un procedimiento para la determinación de reacti-  
25 vos Fc, especialmente del factor de reuma así como del fac-  
tor  $C1_q$  y  $C3d$  del complemento, que se caracteriza porque  
se pone en contacto una solución acuosa, que contiene la  
sustancia que se ha de determinar, con un soporte, al que  
está fijado adhesiva o químicamente un producto de desdo-  
blamiento de una inmunoglobulina con parte Fc inmunológica-

1 mente intacta, después de ello se separa el soporte y se  
pone en contacto el reactivo Fc, fijado al soporte, con un  
anticuerpo, que reacciona con el reactivo Fc, sin reaccio-  
nar cruzadamente con el producto de desdoblamiento de la  
5 inmunoglobulina, y después de esto se determina la canti-  
dad del anticuerpo.

Esta determinación puede efectuarse con métodos  
conocidos por la bibliografía, tales como por ejemplo me-  
diante empleo de un anticuerpo que lleva un agente de mar-  
cación, dirigido contra el reactivo Fc y determinación del  
10 agente de marcación fijado al soporte o libre, o mediante  
medición de la fijación al complemento del anticuerpo que  
reacciona con el reactivo Fc.

Como agentes de marcación son conocidas enzimas  
15 tales como peroxidasa, sustancias fluorescentes tales como  
isotiocianato de fluoresceína (FITC) o sustancias radioac-  
tivas tales como yodo 131.

La fijación de complemento puede detectarse por  
medio de la reacción de fijación de complemento, conocida  
20 para el experto. Esta es descrita por ejemplo en Kurzes  
Lehrbuch der Immunologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart,  
1971, por J. Humphrey, R.G. White.

Objeto de la invención es además un diagnóstico,  
en el que el fragmento Fc de inmunoglobulina G está fija-  
do a un soporte adhesiva o covalentemente a un soporte.

25 Este diagnóstico se pone en contacto conforme al  
procedimiento según la invención con la solución acuosa que  
se ha de ensayar, preferentemente una muestra de suero de  
un persona de ensayo, después de esto se lava detenida-  
mente y a continuación se reune por ejemplo con un anti-  
cuerpo marcado, que está dirigido contra el factor de reuma

1 y que no reacciona con el fragmento Fc.

Anticuerpos adecuados son preferentemente los que están dirigidos contra las cadenas L, los fragmentos Fab o F(ab)<sub>2</sub> de inmunoglobulinas humanas y sus fragmentos de desdoblamiento Fab<sub>2</sub> o Fab.

Agentes de marcación adecuados son colorantes de fluoresceína, enzimas o moléculas radioactivas, que se utilizan según procedimientos descritos para la marcación de anticuerpos, por ejemplo según Wick y otros, Immunfluoreszenz, Med. Verlagsgesellschaft Marburg, 1976; Nakane y otros, J. Histochem. Cytochem. 22, 1977, 1048.

La detección y la determinación del agente de marcación fijado o del no fijado proporcionan información acerca de la presencia y de la cantidad del factor de reuma fijado y con ello una conclusión sobre la cantidad del factor de reuma presente en la solución.

El procedimiento según la invención permite asimismo, como se ha mencionado, detectar otros reactivos Fc, por ejemplo componentes de C1<sub>q</sub> y C3<sub>d</sub> del sistema de complemento. A continuación, en lugar de emplear anticuerpos anti-factor de reuma deben emplearse anticuerpos dirigidos contra C1<sub>q</sub> o contra C3<sub>d</sub>.

Productos de desdoblamiento de la inmunoglobulina en el sentido de la invención, que contienen la parte Fc de la inmunoglobulina o de su fragmento, son por ejemplo las cadenas H de inmunoglobulinas, aisladas según el conocido procedimiento de Franek, F. (1961). Biochem. Biophys. Res. Comm. 4, 28, o los fragmentos Fc, obtenibles después de tratamiento enzimático, por ejemplo con papaína, plasmina o pepsina a partir de inmunoglobulinas según pro-

1 cedimientos conocidos o sus subfragmentos (Bennich, H.,  
Turner, M.W., Biochem. Biophys. Acta 175, 388, 1969; Reid,  
K.B.M., Immunology, 1971, 20, 649; Porter R.R., The Bio-  
chemical Journal, 1959, 73, 119; Haupt, H., Heide, K., 1969,  
5 Klin. Wschr. 47, 270).

El procedimiento para la preparación del fragmen-  
to Fc fijado al soporte puede describirse en general como  
sigue.

10 Un producto de desdoblamiento de la inmunoglobuli-  
na con Fc inmunológicamente intacto, por ejemplo el fragmen-  
to Fc aislado a partir de IgG tal como es descrito por Haupt  
y Heide (Klin. Wschr. 1969, 47, 270) o Porter (The Bioche-  
mical Journal, 1959, 73, 119), se fija adhesiva o covalen-  
temente a una fase sólida.

15 Para el recubrimiento adhesivo, ayudándose de la  
metodología expuesta por Deelder y otros, Exp. Parasitolo-  
gy, 1977, 41, 133, el soporte puede ser tratado con el frag-  
mento Fc. Por ejemplo, se pone en contacto en una dilución  
de 1 g hasta 1  $\mu\text{g/ml}$ , preferentemente 20  $\mu\text{g/ml}$  en solución  
20 acuosa (por ejemplo solución de sal común tamponada con fos-  
fato (PBS), pH 8,4) durante 1 minuto hasta 5 días, prefe-  
rentemente durante 24 horas, y a continuación el fragmento  
Fc en exceso se elimina mediante lavado con tampón (por  
ejemplo PBS, pH 7,2).

25 Fijaciones covalentes del fragmento Fc pueden rea-  
lizarse con los diferentes soportes según procedimientos  
descritos en la bibliografía. (por ejemplo Orth y otros,  
Angew. Chemie, 1972, 84, 319 y siguientes; Silman y otros,  
Am. Rev. Biochem. 1966, 35, 873 y siguientes; Howard and  
30 Weetall, Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies and  
210778

1 Peptides, Marcel Dekker, Inc. Nueva York 1975; Becht y  
otros, J. Immunology, 1968, 101, 18 y siguientes).

El procedimiento de determinación se realiza tal  
como sigue:

5 El soporte recubierto adhesiva o covalentemente  
con el fragmento Fc se incubaba durante desde 10 segundos  
hasta 48 horas, preferentemente durante 1 hora, con la  
muestra de ensayo, por lo general suero sanguíneo, en una  
serie de diluciones, preferentemente 1:1, 1:4, 1:16, 1:32  
10 etc., a 4°C hasta 37°C, preferentemente a 20°C, y a conti-  
nuación se lava para eliminar componentes de suero no fija-  
dos.

A continuación el soporte tratado de esta manera  
se pone en contacto con una solución de un anticuerpo pro-  
15 visto con un agente de marcación, que está dirigido contra  
cadenas L, fragmentos Fab o F(ab)<sub>2</sub> de inmunoglobulinas o  
contra C1<sub>q</sub> o contra C3d. Una dilución adecuada se deter-  
mina en ensayos previos en una carga de ensayo que no con-  
tiene el reactivo Fc buscado. Esta es la dilución más pe-  
20 queña en la que el anticuerpo marcado no reacciona con el  
soporte, recubierto con el fragmento Fc. Ella se encuentra  
en 1:1 hasta 1:500, preferentemente en 1:100, La incuba-  
ción se realiza a 4°C hasta 37°C, preferentemente a 20°C,  
durante 10 segundos hasta 48 horas, preferentemente duran-  
25 te 1 hora. A continuación el anticuerpo no fijado se eli-  
mina mediante lavado con líquido de dilución, por ejemplo  
PBS, pH 7,2 y el agente de marcación que se encuentra en  
el soporte o el agente de marcación libre se determina se-  
gún procedimientos conocidos en sí.

30

Se ha hallado además que con ayuda de productos

1 de desdoblamiento, fijados al soporte, de inmunoglobulinas  
puede constituirse un método altamente sensible para la de-  
terminación de inmunocomplejos de antígenos y anticuerpos,  
aglomerados de anticuerpos y productos de desdoblamiento  
5 de anticuerpos. En efecto se ha manifestado que para el  
análisis de inmunocomplejos de antígenos y anticuerpos,  
aglomerados de anticuerpos y productos de desdoblamiento  
de anticuerpos, en lugar del RF, empleado por lo general  
para ello hasta ahora, pueden emplearse también anticuer-  
10 pos contra inmunoglobulina inmunológicamente modificada. La  
especificidad de los anticuerpos debe estar dirigida contra  
la inmunoglobulina, que tiene una modificación inmunológi-  
ca mediante fijación a un soporte, a un antígeno o mediante  
reacción consigo misma. Puede estar dirigida también contra  
15 productos de desdoblamiento de la inmunoglobulina, que con-  
tienen la parte Fc de la inmunoglobulina o constituyen los  
fragmentos de la parte Fc.

Un objeto adicional de la invención es por consi-  
guiente un procedimiento para la determinación de inmu-  
20 globulina inmunológicamente modificada, sobre todo de com-  
plejos de antígenos y anticuerpos, aglomerados de anticuer-  
pos o productos de desdoblamiento de anticuerpos en líqui-  
dos, que se caracteriza porque a un líquido, que contiene  
la sustancia que se ha de determinar, se añade un reactivo  
25 Fc en exceso, la mezcla de reacción se pone en contacto con  
un soporte, al que está fijado adhesiva o químicamente un  
producto de desdoblamiento de la inmunoglobulina con parte  
Fc inmunológicamente intacta, después de esto se separa  
el soporte y finalmente se determina el reactivo Fc libre o  
30 fijado.

1 Si se marca el reactivo Fc propiamente dicho, pue  
de sacarse primeramente, a través de la determinación del  
agente de marcación, la conclusión sobre la cantidad del  
reactivo Fc y a partir de aquí sobre la inmunoglobulina in-  
5 munológicamente modificada. Aun cuando este procedimiento  
puede realizarse muy sencillamente, requiere la purifica-  
ción de los reactivos Fc, con las dificultades unidas con  
ello.

10 Preferentemente el procedimiento se realiza por  
medio de la determinación indirecta del reactivo Fc. Para  
ello se añade el reactivo Fc en exceso al líquido, que con-  
tiene la inmunoglobulina, inmunológicamente modificada, que  
se ha de determinar. La mezcla de reacción se pone en con-  
tacto con un soporte, al que está fijado adhesiva o quími-  
15 camente un producto de desdoblamiento de la inmunoglobuli-  
na. Después de esto se separa el soporte, se lava varias  
veces y finalmente se pone en contacto con un anticuerpo  
que lleva un agente de marcación, que está dirigido contra  
determinantes antígenos del reactivo Fc y después de lavar  
20 repetidamente se determina el agente de marcación libre o  
fijado al soporte.

El procedimiento de determinación, realizado de  
esta manera, se distingue además por una sensibilidad es-  
pecialmente elevada.

25 Reactivos Fc en el sentido de la invención son  
los compuestos que son capaces de fijar la llamada parte  
Fc de una molécula de inmunoglobulina inmunológicamente  
modificada. Son preferidos el factor de reuma (RF), el fac-  
tor de complemento (C<sub>1q</sub>) y anticuerpos contra inmunoglobuli-  
30 lina inmunológicamente modificada en la parte Fc.

1

El producto de desdoblamiento de la inmunoglobulina, que está fijado al soporte, debe contener la parte Fc o fragmentos todavía inmunológicamente activos de la parte Fc.

5

El anticuerpo que lleva la característica de marcación se selecciona de manera tal que no debe reaccionar cruzadamente desde el punto de vista inmunológico con el producto de desdoblamiento de la inmunoglobulina que se encuentra sobre el soporte.

10

La medición subsiguiente de la característica de marcación permite, a través de una determinación cuantitativa del reactivo Fc fijado al soporte o del reactivo Fc consumido en el líquido que se ha de analizar, una referencia regresiva a la cantidad presente de complejos de antígenos y anticuerpos, aglomerados de anticuerpos y productos de desdoblamiento de anticuerpos.

15

Se obtienen anticuerpos contra inmunoglobulina inmunológicamente modificada en la parte Fc mediante inmunización de animales con una inmunoglobulina inmunológicamente modificada o con la parte Fc aislada.

20

La modificación inmunológica en la parte Fc puede producirse por ejemplo mediante fijación de la inmunoglobulina a un soporte, a un antígeno o mediante reacción consigo misma, es decir mediante formación de aglomerados.

25

Soportes adecuados en el sentido de la invención, a los que son fijados productos de desdoblamiento de la inmunoglobulina y que pueden reaccionar con reactivos Fc en forma de una aglutinación, son especialmente cuerpos moldeados inorgánicos y orgánicos. Los cuerpos moldeados inorgánicos constan por ejemplo de vidrio, los cuerpos moldea-

30

210778

1 dos orgánicos por ejemplo de homopolímeros o copolímeros  
de compuestos vinílicos, tales como olefinas, acetato de  
vinilo, cloruro de vinilo, cloruro de vinilideno, tetra-  
5 fluoroetileno, estireno, ácido acrílico o ácido metacrí-  
lico, además de polímeros de formaldehído y de acetales  
cíclicos, así como de policondensados, tales como poliés-  
teres, policarbonatos o poliamidas. También son adecuados  
hidratos de carbono reticulados y proteínas reticuladas.  
10 Los cuerpos moldeados son preferentemente esferas o elip-  
soides. Entran en consideración además cuerpos moldeados  
de planos paralelos y también cuerpos moldeados configura-  
dos de manera diferente, preferentemente cuerpos óptica-  
mente transparentes tales como portaobjetos, en primer tér-  
mino tubos de ensayo. Los cuerpos moldeados orgánicos pue-  
15 den ser también de origen biológico. Como tales se prefie-  
ren los glóbulos rojos de hombres o de animales. También  
pueden utilizarse materiales amorfos en calidad de sopor-  
tes.

20 Un objeto preferido de la invención es un agente  
para la determinación de inmunoglobulina inmunológicamente  
modificada, que contiene la parte Fc de la inmunoglobulina,  
fijada a un cuerpo moldeado ópticamente transparente.

25 El origen de las inmunoglobulinas necesarias pa-  
ra la preparación de estos productos de desdoblamiento se  
rige según la especie con la que ha de detectarse immuno-  
globulina inmunológicamente modificada. Como óptimo se ha  
manifestado el sistema homólogo, es decir los productos  
de desdoblamiento fijados al soporte proceden de la misma  
especie que las inmunoglobulinas, inmunológicamente modifi-  
30 cadas, que se han de determinar. En el procedimiento según

1 la invención pueden utilizarse sin embargo también produc-  
tos de desdoblamiento de otras especies, con tal de que en  
ellas exista una reacción cruzada inmunológica con respecto  
a la parte Fc de los compuestos de anticuerpos o fragmentos  
5 de anticuerpos que han de determinarse. Un ejemplo de ta-  
les pares de especies, capacitadas para reacciones cruza-  
das, es la combinación de conejo/hombre.

El factor de complemento C1<sub>q</sub> aparece en la natu-  
raleza. Puede aislarse por ejemplo a partir de suero san-  
guíneo. Se describe su aislamiento a partir del suero de  
10 hombre, de conejo o de vacuno.

El factor de reuma RF es una proteína que aparece  
en el suero de hombre, más raramente en el suero de otras  
especies, en el caso de determinadas enfermedades reuma-  
15 toides. RF puede formarse "artificialmente" mediante in-  
munización con complejos de antígenos y de anticuerpos o  
aglomerados de anticuerpos. Tales aglomerados de anticuer-  
pos pueden obtenerse por ejemplo calentando inmunoglobuli-  
nas purificadas durante algunos minutos a temperaturas de  
20 alrededor de 60°C. RF se forma también inmunizando con frag-  
mentos de anticuerpos que contienen Fc, tales como cadenas  
H de inmunoglobulinas o con fragmentos Fc, obtenidos median-  
te tratamiento con papaína, plasmina o pepsina de immuno-  
globulinas o de fragmentos de la parte Fc de inmunoglobuli-  
25 nas. Después de la formación de los anticuerpos correspon-  
dientes se aísla, según procedimientos conocidos, a partir  
del suero de los animales inmunizados la fracción que con-  
tiene anticuerpos y, si se desea, se enriquecen y concen-  
tran.

1 el RF que posee una especificidad inmunológica tanto contra  
la inmunoglobulina, inmunológicamente modificada, que ha de  
detectarse en el líquido que se ha de ensayar como también  
contra los productos de desdoblamiento de inmunoglobulinas  
5 fijados al soporte. Un anticuerpo contra el reactivo Fc que  
lleva un agente de marcación, que ha de emplearse eventual-  
mente no puede reaccionar con los productos de desdoblamien-  
to de inmunoglobulinas fijados al soporte. Esto se garanti-  
za o bien porque el producto de desdoblamiento fijado al  
10 soporte y el Rf proceden de diferentes especies y/o porque  
sus determinantes antígenos no reaccionan cruzadamente en  
el sentido inmunológico. Así, se selecciona por ejemplo un  
anticuerpo que está dirigido contra las cadenas L de RF, y  
un producto de desdoblamiento de la inmunoglobulina para  
15 la fijación a un soporte, que no contiene ninguna cadena L.

La invención se explica más detalladamente por  
medio de los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1:

Determinación de factores de reuma

20 En tubitos de poliestireno (capacidad 400  $\mu$ g) se  
ensasan 100  $\mu$ g de una solución de fragmento Fc de IgG huma-  
no, preparada según Haupt y Heide (Klin. Wschr., 1969, 47,  
270) en una concentración de 20  $\mu$ g/ml en tampón de fosfato  
de sodio, pH 8,3, según Sørensen y se almacenan a 20°C. Des-  
25 pués de 18 horas se filtra con succión la solución. Los tu-  
bitos se lavan tres veces con solución de sal común (PBS)  
tamponada con fosfato, que contiene 0,1 % (g/V) de monolau-  
reto de polioxietilensorbitan (Tween 20) mediante introduc-  
ción y filtración con succión. En los tubitos vaciados, re-  
30 cubiertos, se introducen cada vez 100  $\mu$ g de la muestra que

1 contiene factor de reuma, diluido a 1:4, 1:8 y 1:16 con  
-PBS, que contiene 10 mg/ml de albúmina de suero de vacuno  
(ASV) y se deja reposar a 20°C. Después de 2 horas se fil-  
tra con succión la solución. Los tubitos se lavan tres ve-  
5 ces con PBS que contiene Tween 20 (1 mg/ml), introduciendo  
y filtrando con succión. A continuación se introducen en  
los tubitos 100 µl de un anticuerpo de conejo anti-cadenas-  
-I-humanas marcado con peroxidasa según el procedimiento de  
Nakane y Kawave, J. Histochem. Cytochem., 1972, 22, 1084,  
10 que está diluido (a 1:200 correspondientemente a 25 mg de  
proteína de anticuerpos/ml) con PBS, pH 7,2, que contiene  
50 mg/ml de ASV. Después de un almacenamiento durante más  
de 1 hora a 20°C se lavan nuevamente los tubitos tres ve-  
ces con PBS, que contiene Tween 20. A continuación se in-  
15 troducen con pipeta por cada tubito 100 µl de una solución  
de ortofenilendiamina al 0,1 %, preparada recientemente,  
en tampón de citrato-fosfato (5 ml de ácido cítrico 0,1 M  
+ 5 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M), mezclada con 0,1 ml de una solu-  
ción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1% (v/v). Después de aproximadamente 30 mi-  
20 nutos de almacenamiento de los tubitos en la oscuridad la  
reacción se detiene mediante adición de 100 µl de una so-  
lución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N, y la extinción de la solución de reac-  
ción que se encuentra en los tubitos se mide a 490 nm con  
ayuda de un fotómetro.

25 En la tabla 1 están reproducidos los resultados  
de 48 sueros de pacientes con enfermedades reumáticas en  
comparación con uno que no tenía ningún factor reumático.

1

Tabla 1

Ensayo de detección de RF con Tc fijado a soporte

Suero RF N <sup>o</sup> (Dilución 1:4)	(Reacción con peroxidasa) E490	Valoración
5	157	0,253 +
	1	0,449 +
	2	0,239 +
	8	0,289 +
	9	0,247 +
10	10	0,091 -
	11	0,255 +
	12	0,432 +
	14	0,128 -
	15	0,251 +
15	16	0,371 +
	17	0,154 -
	18	0,322 +
	19	0,380 +
	20	0,523 +
20	21	0,281 +
	22	0,187 -/+
	24	0,154 -
	25	0,137 -
	26	0,168 -
25	27	0,375 +
	28	0,435 +
	29	0,194 +/-
	31	0,153 -
	39	0,692 +
30	43	0,384 +

1

Tabla 1 (continuación)

Suero RF N.º (Dilución 1:4)	(Reacción con peroxidasa) E490	Valoración
45	0,219	+
51	0,367	+
54	0,318	+
56	0,460	+
59	0,404	+
60	0,220	+
62	0,364	+
66	0,179	+/-
68	0,241	+
72	0,448	+
73	0,407	+
75	0,256	+
77	0,201	+
103	0,311	+
105	0,209	+
120	0,163	-
122	0,164	-
123	0,335	+
130	0,170	-
147	0,193	+
149	0,208	+
155	0,323	+
Testigo negativo	0,158	-
(no está contenido ningún factor de reuma)		

5

10

15

20

25

30

210778

1 Ejemplo 2:Determinación del factor de complemento C1<sub>q</sub>

Una lámina de poli(metacrilato de metileno) con grupos amido, insertada según el procedimiento de Lynn (Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies and Peptides, Roward y Weetall, Marcel Dekker, Inc., Nueva York 1975, 32) se incorpora en una solución de 10 mg/ml de fragmento Fc de IgG humano en PBS, pH 7,2, durante 24 horas a 4°C y a continuación se lava tres veces mediante inmersión en PBS, pH 7,2, que contiene 10 mg/ml de ASV.

Láminas recubiertas de esta manera se sumergen en diferentes sueros de pacientes durante 2 horas a 20°C.

Para comparación se tratan al mismo tiempo una solución de PBS, pH 7,2, y una segunda solución, que contiene 50 µg/ml de C1<sub>q</sub> y 10 mg/ml de ASV. A continuación se lava la lámina tres veces mediante inmersión en PBS, pH 7,2, que contiene 10 mg/ml de ASV, y a continuación se sumerge durante 2 horas a 20°C en una solución de anticuerpos de conejo anti-C1<sub>q</sub>, marcados con FITC, en una concentración de 0,5 mg/ml de PBS, pH 7,2, que contiene 10 mg/ml de ASV, y seguidamente se lava dos veces con PBS, pH 7,2, que contiene 10 mg/ml de ASV, mediante inmersión y a continuación en agua destilada. Después de secar al aire, la lámina se pega con un pegamento (Eukitt, exento de fluorescencia) sobre un portaobjetos de vidrio y se mide la fluorescencia en comparación con un patrón (vidrio de uranilo) en un fluorímetro (Axionat, Firma Zeiss). Los resultados están expuestos en la tabla 2. Manifiestan claramente la detección de C1<sub>q</sub> en sueros de pacientes con inflamaciones crónicas en comparación con un testigo positivo o negativo en cada caso.

1

Tabla 2

Fluorescencia de FOTC en comparación con patrón de vidrio de uranilo

Testigo negativo (nada de  $C1_q$ ) 11

5

Testigo positivo

$C1_q$  50  $\mu\text{g/ml}$  49,3 + 6,0

Suero de pacientes

(inflamaciones crónicas)

1 23,9

10

2 17,2

3 22,6

4 23,4

5 22,1

Ejemplo 3

15

Mediante desdoblamiento de la inmunoglobulina humana G con papaína y subsiguiente separación por cromatografía sobre gel de los productos de desdoblamiento conforme al procedimiento según Porter, R.R., The Biochemical Journal 72, 1959, se aísla el fragmento Fc y se disuelve en solución de sal común tamponada con fosfato al 1%, de pH 8,3.

20

25

Una lámina de 50  $\mu$  de espesor de polimetacrilato (80 x 250 mm) se trata durante 15 minutos a 90°C con hidrato de hidrazina, se lava con metanol, al que se había añadido algo de ácido acético y a continuación se lava con agua. La lámina se introduce en una solución de 1.000 ml de agua/hielo, 500 ml de ácido clorhídrico y 120 ml de solución de nitrito de sodio. Después de 15 minutos la lámina se lava a neutralidad con agua/hielo y se seca en una instalación de secado por congelación.

30

210778

1 Una lámina de poli(metacrilato de metilo) activa-  
da de tal modo se sumerge en la solución al 1% del frag-  
mento Fc en solución de sal común tamponada con fosfato, pH  
8,3, y se deja en la solución durante 48 horas a 4°C. A  
5 continuación se lava la lámina 3 veces con solución de sal  
común tamponada con fosfato de pH 7,2 y se corta en partes.

Para la determinación de inmunoglobulina inmunoló-  
gicamente modificada en forma de inmunocomplejos se prepa-  
ra una serie de diluciones de la solución que se ha de in-  
10 vestigar con solución de sal común tamponada con fosfato.  
Para ello se mezclan en cada caso 40  $\mu$ l, de las diluciones  
de una serie de diluciones cada vez con 40  $\mu$ l de un suero  
humano, que contiene una elevada proporción de RF (título  
de 1:1500 en la aglutinación de látex y RF) y se deja la  
15 mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente. A conti-  
nuación se sumerge en cada mezcla una lámina recubierta  
covalentemente con fragmentos Fc tal como se ha descrito,  
y se incuba durante 2 horas a 20°C. En una serie de testi-  
go se utiliza una solución de sal común al 0,9 % en lugar  
20 de suero que contiene RF.

Después de lavar 3 veces las láminas en solución  
de sal común tamponada, pH 7,2, se sumergen en una solu-  
ción al 1 % del anticuerpo de conejo anti cadenas L de  
inmunoglobulina humana, que está marcado con isotiociana-  
25 to de fluoresceína (FITC) y se deja allí a temperatura am-  
biente durante 2 horas. A continuación se lavan las lámi-  
nas dos veces con solución de sal común tamponada con fos-  
fato, pH 7,2, y a continuación una vez con agua destilada.

En un aparato para la determinación cuantitativa de  
30 inmunofluorescencia (Axiomat, Carl Zeiss, Oberkochen) se

1 determina la intensidad de fluorescencia sobre un recorte  
establecido de la lámina. Este es un criterio de medida  
para la cantidad de RF fijada al fragmento Fc. Esta es a  
su vez tanto menor, cuanto más RF está fijado a inmunocom-  
5 plejos.

Con el procedimiento descrito pueden detectarse  
todavía éstos en preparaciones que contienen inmunocomple-  
jos en una dilución de 1:8.000.

10 Se puede conseguir una sensibilidad comparativamen-  
te elevada, si en lugar del anticuerpo de conejo anti cade-  
nas L de inmunoglobulina humana se emplea un anticuerpo con-  
tra fragmentos Fc de gamma globulina de conejo y/o si en lu-  
gar de RF se utiliza un anticuerpo contra el fragmento Fc  
obtenido mediante desdoblamiento de papaina de inmunoglobu-  
15 lina.

En lugar de RF puede utilizarse también  $C1_q$  humano  
y en lugar de anticuerpos de conejo anti-cadenas L de inmu-  
noglobulina marcados con FITC, anticuerpos de conejo anti  
20  $C1_q$  marcados con FITC.

20

25

1

REIVINDICACIONES

5

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

10

1ª.- Procedimiento para la determinación de reactivos Fc, tales como factor de reuma,  $C1_q$  y  $C3_d$ , que se caracteriza porque se pone en contacto un líquido, que lo contiene, con un producto de desdoblamiento de una inmunoglobulina, fijado a un soporte, después de esto se separa el soporte y se pone en contacto el reactivo Fc fijado al soporte con un anticuerpo, que reacciona con el reactivo Fc, sin reaccionar cruzadamente con el producto de desdoblamiento de la inmunoglobulina, y después de esto se determina el anticuerpo.

15

20

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, que se caracteriza porque el anticuerpo que reacciona con el reactivo Fc lleva un agente de marcación, cuya cantidad fijada al soporte o cuya cantidad no fijada se determina.

25

3ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, que se caracteriza porque como anticuerpo que reacciona con el reactivo Fc se emplea un anticuerpo que está dirigido contra cadenas L o fragmentos Fab de inmunoglobulinas.

4ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, que se caracteriza porque como anticuerpo que reacciona con el reactivo Fc se emplea un anticuerpo que está dirigido contra  $C1_q$ .

30

5ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, que se caracteriza porque como anticuerpo que reacciona



1 con el reactivo Fc se emplea un anticuerpo que está diri-  
gido contra C<sub>3</sub>d.

6a.- "PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION DE  
REACTIVOS Fc".

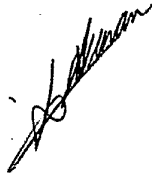
5 Tal y como se ha descrito en la Memoria que an-  
tecede y para los fines que se han especificado.

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

10

Madrid, 07.NOV.1978

P.A.



**Alberto de Elizaburu**  
Por Poder



15

20

25

30