

MINISTERIO DE INDUSTRIA  
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



Los datos que figuran en este formulario se refieren a la descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

(11) ES	NUMERO	(10) A1
(23)	<b>475984</b>	
(22)	FECHA DE PRESENTACION	
	<b>11 DIC. 1978</b>	

(RAN 4093/24-001)

**PATENTE DE INVENCION**

(90) PRIORIDADES: (91) NUMERO	(92) FECHA	(93) PAIS
10859/77	15 Marzo 1977	Inglaterra

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(61) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	GO 1N	patente de invención 467.831 del 14-3-78.

(64) TITULO DE LA INVENCION
"UN METODO PARA DETERMINAR UN MATERIAL INMUNOLOGICAMENTE ACTIVO EN UNA MUESTRA"

(71) SOLICITANTE (S)
F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE. S.A.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
BASILEA (Suiza)

(72) INVENTOR (ES)
Douglas E. Hawley Peter G. Tonkes

(73) TITULAR (ES)
F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE. S.A.

(74) REPRESENTANTE
D. JAIME ISERN CUYAS, Agente Oficial de la Propiedad Industrial

**POOR  
QUALITY**

MEMORIA DESCRIPTIVA

El presente invento se refiere a nuevos reactivos para la determinación de materiales inmunológicamente activos y a métodos inmunológicos que utilizan dichos reactivos.

5

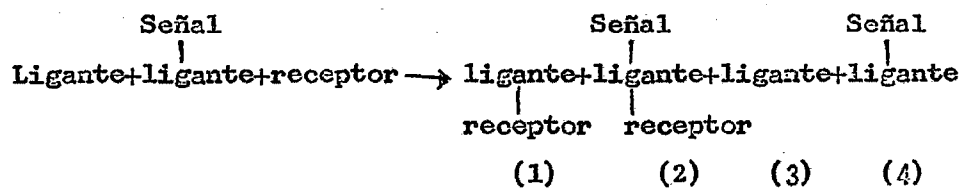
En los últimos años se han desarrollado muchos sistemas analíticos basados en análisis de ligazón de proteínas competitivos (llamado también análisis de saturación).

10

Los términos "análisis de saturación" y "análisis de ligazón de proteínas competitivos", que son sinónimos, se refieren a sistemas analíticos utilizados para la determinación de materiales inmunológicamente activos (ligantes). Los resultados de estas determinaciones, los fluidos biológicos, son utilizados en diagnóstico médica y veterinaria. La diagnosis depende del nivel de la substancia determinada, normal o patológica. El principio analítico se basa, por ejemplo, en la competición entre un ligante y un ligante señalado para un agente ligante específico común (receptor), tal como se ilustra en la ecuación siguiente:

15

20



25

Ecuación 1

La reacción primaria es una combinación de una molécula de ligante con una molécula de receptor para formar un complejo ligante/receptor bimolecular (1).

30

Una reacción secundaria se produce por la adición de ligante

señalado que se combina similarmente con el receptor para formar un complejo ligante/receptor señalado (2). En el análisis de saturación la concentración del receptor y del ligante señalado son constantes. La concentración del receptor es limitada de modo que el ligante señalado se encuentre en exceso con respecto al receptor. Bajo estas condiciones la adición de ligante causa competición entre ligante y ligante señalado para la ligazón con el receptor. De aquí que un aumento en la concentración del ligante hace descender la cantidad total de ligante señalado/receptor. El principio del ensayo se basa en la determinación del porcentaje del total de ligante señalado enlazado al receptor. Este porcentaje es inversamente proporcional a la cantidad de ligante adicionado a la mezcla reaccional a partir de la muestra que ha de medirse o a partir del estándar utilizado en el ensayo. La disminución en la concentración del complejo ligante señalado/receptor o el aumento en la concentración de ligante señalado en la mezcla reaccional puede utilizarse para determinar la concentración de ligante.

La sensibilidad del análisis de saturación depende del empleo de un receptor que tiene una afinidad muy elevada para el ligante y ligante señalado. En segundo lugar, la sensibilidad depende también del empleo de una señal que puede detectarse a una concentración muy baja.

La especificidad del análisis de saturación depende de la capacidad del receptor para ligar exclusivamente en ligante y ligante señalado en una mezcla compleja de moléculas distintas.

El análisis de saturación se ha utilizado empleando muchas técnicas distintas, refiriéndose principalmente las diferencias al tipo de señal utilizada. Por lo

general estas técnicas se clasifican utilizando títulos amplios "radioensayo" o "no-radioensayo", dependiendo de si se utiliza o no un trazador radioactivo como la señal.

5 El radioensayo se ha utilizado en mayor extensión que los no-radioensayos. El radioensayo puede clasificarse adicionalmente como radioinmunoensayo o ensayo radio-receptor, dependiendo del tipo de receptor utilizado en el ensayo. El radioinmunoensayo utiliza un anticuerpo que enlaza específicamente el ligante y el ligante señalado. Alternativamente, el análisis de radio-receptor se refiere al empleo de cualquier otro tipo de receptor biológico que enlazará similarmente y de forma específica el ligante y el ligante señalado.

15 En todas las técnicas de radioensayo es esencial separar físicamente la fracción enlazada (1 y 2 de la ecuación 1) de la fracción no enlazada (3 y 4 de la ecuación 1) de la mezcla reaccional. Puede obtenerse subsiguientemente un índice de la concentración de ligante contando estas fracciones en un contador de radioactividad y comparando las cuentas obtenidas para las muestras desconocidas con las obtenidas para las muestras de ligante estándar apropiadas sometidas al mismo ensayo. Se han descrito muchos métodos distintos y diversos para la separación de las fracciones enlazadas y libres de la mezcla reaccional de radioensayo utilizando técnicas que incluyen filtración de gel, absorción y cromatografía de intercambio iónico, precipitación fraccionada, fase sólida o electroforesis.

25 Subsiguiente al desarrollo de las técnicas de radioensayo en los análisis de saturación, se han desarrollado métodos que utilizan señales no radioactivas. Se han demostrado métodos utilizando enzimas en calidad de

la señal. Estos métodos tienen la ventaja de que la separación física de las fracciones enlazadas (1 + 2) y libres (3 + 4) del ligante señalado no es necesaria en el proceso de ensayo.

5                    Cuando el anticuerpo enlaza el ligante señalado con una enzima, se modifica la actividad de la enzima. El grado de modificación de la actividad enzimática es indicativo de la concentración del ligante señalado en la fracción enlazada y por tanto da un índice de la concentración de ligante en la mezcla reaccional.

10                    La estructura química del complejo ligante-enzima es extremadamente difícil de determinar y ello constituye una desventaja principal del inmunoensayo enzimático. Esto se debe indudablemente a la gran multiplicidad de cadenas laterales de aminoácido que se encuentran en la superficie enzimática para el acopleamiento con el ligante. Esto causa una gran dificultad en reproducir en ligante-enzima en diferentes preparaciones del complejo. La carencia de control general de la reacción acopleante resulta en la obtención de muchas moléculas ligantes a la molécula enzimática, aunque es probable que el enlace de solo unas pocas de estas moléculas ligantes por el anticuerpo viene implicado por la inhibición de la actividad enzimática.

15                    De aquí que no todas las interacciones anticuerpo/antígeno señalado resultan en una modificación de la actividad enzimática, haciendo descender por tanto la sensibilidad de la técnica.

20                    La interacción proteína-proteína entre distintas moléculas de anticuerpo y anticuerpo y moléculas enzimáticas es otra consecuencia de la multiplicidad de moléculas

las ligantes en la superficie enzimática. La interacción proteína-proteína se ve ulteriormente aumentada cuando el ligante es también un polipéptido. De aquí que la molécula enzimática induce un micro-ambiente localizado de elevada concentración proteínica. En estas situaciones se ha demostrado que se produce precipitación proteínica, causando por tanto una pérdida de una de las ventajas principales del inmunoensayo enzimático por necesitar separación del anticuerpo enlazado y fracciones libres.

5

10

Se ha descrito una modificación de inmunoensayo enzimático que supera parcialmente estos problemas - por cuanto el ligante es señalado con una molécula detectora que es de bajo peso molecular. En este enlace de anticuerpo de ensayo de ligante señalado se obstaculiza estéricamente el enlace de molécula detectora por otro anticuerpo específico para la molécula detectora.

15

20

El grado de obstaculización se determina por la competición para enlazar la molécula detectora libre de ligante y la molécula detectora señalada por enzima con anticuerpo de molécula detectora. El grado de modificación de actividad enzimática, según se determina en ensayo inmunológico enzimático normal, es indicativo de la concentración de molécula detectora libre de ligante que es asimismo indicativo de la concentración de ligante en la mezcla reaccional. La ventaja de esta técnica consiste en que se enlaza al ligante una pequeña molécula en vez de una enzima, con lo que se permite la determinación de la estructura química del ligante señalado y por tanto superar muchas de las desventajas del inmunoensayo enzimático anteriormente descritas.

25

30

Sin embargo, este sistema solo supera las desventajas de la reacción de ligazón primaria que implica el ligante y el ligante señalado y las transfiere al sistema detector para de

terminar el grado de fracciones de anticuerpo enlazado y fracciones libres del ligante señalado.

5 Las desventajas de los métodos del arte anterior se superan con el presente invento según el cual se utiliza como señal un modificador de enzima.

10 Mas particularmente el presente invento se refiere a un reactivo para la determinación de un material inmunológicamente activo, que comprende el material inmunológicamente activo o un receptor que puede ligar específicamente dicho material inmunológicamente activo, señalado con una substancia capaz de modificar la extensión o el modo de actividad de una enzima.

15 Además el presente invento se refiere a un método para la determinación de un material inmunológicamente activo en una muestra en donde la muestra se pone en contacto con un receptor que puede ligar específicamente el material inmunológicamente activo, el material inmunológicamente activo señalado con una substancia capaz de modificar la actividad de una enzima, una enzima y un substrato enzimático, y en donde la extensión o modo de la actividad enzimática resultante se mide y compara con la obtenida con un estándar.

25 Además el presente invento se refiere a un método para la determinación de un material inmunológicamente activo en una muestra en donde la muestra se pone en contacto con un receptor que puede ligar específicamente el material inmunológicamente activo y que se señala con una substancia capaz de modificar la actividad de una enzima, con el material inmunológicamente activo en forma insolubilizada, 30 y con una enzima y un substrato enzimático, y en donde la extensión o el modo de la actividad enzimática, después de

la separación de la fase sólida, se mide y compara con la obtenida con un estándar.

Los términos "material inmunológicamente activo" o "ligante" en esta descripción se refiere a cualquier  
5 substancia inmunológicamente activa o parte de ésta capaz de determinarse inmunológicamente, por ejemplo utilizando técnicas de análisis de saturación. La exigencia esencial estriba en que sea un receptor que enlace específicamente el ligante. Cuando el receptor es un anticuerpo el ligante  
10 será hapténico o antigénico de modo que pueda formarse el anticuerpo específico. Un ligante se refiere como un hapteno cuando éste solo atraiga la formación de anticuerpo al unirse a un compuesto con propiedades antigénicas. Alternativamente, se hace referencia a un ligante -  
15 como un antígeno cuando atraiga la formación de anticuerpo sin modificación química.

El ligante puede variar ampliamente en peso molecular oscilante entre aproximadamente 100 - 1.000.000. Esta gama de peso molecular no es limitativa en el ensayo  
20 siempre que se encuentre disponible el receptor que enlace específicamente el ligante.

El ligante puede ser de estructura polimérica o no polimérica. Cuando es polimérica el ligante será usualmente de origen biológico y se clasificará como un -  
25 polisacárido de ácido nucleico y/o polipéptido. Alternativamente, cuando el ligante no es polimérico, tendrá generalmente un peso molecular inferior a 2.000 y puede tener una amplia variedad de estructuras, funcionalidades y propiedades fisiológicas.

30 Los ligantes de particular importancia que pueden utilizarse en el presente invento son aminas, aminoá

cidos, péptidos, proteínas, lipoproteínas, glicoproteínas, esteroides, esteroides, lipoides, ácidos nucleicos, mono- y poli-sacáridos, alcaloides, vitaminas, drogas, narcóticos, antibióticos, metabolitos, pesticidas, toxinas, contaminan-  
5 tes industriales, agentes saborizantes, hormonas, enzimas, coenzimas, componentes celulares o extracelulares de tejidos y anticuerpos aislados de humanos o animales.

Sin embargo, el ensayo no se limita a solo estos ligantes. Los componentes de potencial inmediato para análisis con el sistema son antígeno B-superficial de hepatitis, ferritina, antígenos tumorales tal como CEA; alfa-feto-proteína; factor reumatoide; proteínas C-reativas; clases de inmunoglobulina IgG, IgM o IgA; mioglobina, hormonas tiroideas incluyendo T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>, insulina, hormonas esteroides incluyendo testosterona o estradiol; fármacos de abuso incluyendo analgésicos narcóticos, como morfina; habituratos; estimulantes como amfetamina; fármacos para el tratamiento de epilepsia incluyendo difenil-hidantoína y fenobarbital; glicocitos cardiacos tal como digoxina; vitaminas como  
15 vitamina B<sub>12</sub> y ácido fólico. Además, los anticuerpos que tienen potencial inmediato para análisis con el sistema son aquellos asociados con infección en sífilis, gonorrea, brucellosis, rubella y reumatismo.

El término "material activo inmunológicamente señalado" o "receptor señalado" en esta descripción se refiere a un ligante, análogo de un ligante o parte de éste o a un receptor que se señala con un modificador enzimático. Puede enlazarse una, mas de una y por lo general  
25 menos de 100 moléculas de señal a un ligante o molécula receptora. De modo análogo puede enlazarse una, mas de una y usualmente menos de 5 moléculas de ligante o receptor a una  
30

molécula de señal. El enlace de extra-moléculas de señal a una molécula de ligante o receptor aumento general la sensibilidad del ensayo siempre que las extra-señales no afecten la unión.

5                   La ligazón de una molécula modificadora a una molécula ligante o receptora implica la formación de enlaces intermoleculares que en la mayoría de los casos, pero no necesariamente, son covalentes en naturaleza. La ligazón puede llevarse a cabo en ciertos casos en presencia de un agente acoplante mediante la inserción de un grupo enlazante entre la señal y el ligante o receptor.

10

                  La molécula modificadora puede unirse directamente al ligante o a la molécula receptora. Sin embargo - puede ser deseable insertar puentes químicos de diversa longitud entre la molécula modificadora y las moléculas de ligante o receptor dependiendo del ensayo específico previsto. En ciertos casos puede aún ser ventajoso unir la molécula - modificadora y las moléculas de ligante o receptor por separado a la misma molécula portadora, por ejemplo una macromolécula como un polipéptido o polisacárido.

15

20

                  El término "receptor" en esta descripción se refiere a cualquier substancia que puede enlazar específicamente ligante y ligante señalado o parte de éstos. Por lo general el receptor utilizado en el ensayo es un anticuerpo específico para el ligante formado en la sangre de vertebrados siguiendo la inyección de hapteno o antígeno apropiado. Alternativamente, pueden utilizarse también en el ensayo receptores que se encuentran en estado natural. Este último grupo incluye, aunque sin limitación, proteínas, ácidos nucleicos y membranas celulares. Estos receptores se han utilizado en técnicas de radioensayo para trioxina, in-

25

30

ulina, angiotensina y diversas hormonas de esteroide.

En caso que el ligante sea un anticuerpo el receptor puede ser el antígeno utilizado para inducir dicho anticuerpo en un animal huésped. En otra modalidad el receptor puede ser un anticuerpo frente al anticuerpo que ha de determinarse.

No resulta posible determinar con certeza el modo de acción receptora que, con la ligazón del ligante señalado, reduce la interacción entre enzima y modificador. La explicación mas probable es que la afinidad de la enzima para el modificador se reduce como resultado de un cambio en el tamaño y carga neta del complejo de receptor/ligante-modificador comparado al del ligante-modificador solo.

El término "modificador" en esta descripción se refiere a cualquier substancia que pueda interactuar con una enzima tal que la extensión o el modo de la actividad enzimática sea modificada. Esta modificación puede resultar en una inhibición, activación o cambio en la especificidad de cualquier otra propiedad de la enzima que sea detectable directa o indirectamente por un cambio en la actividad enzimática o en el modo de la actividad, por ejemplo, un cambio en las condiciones de reacción como exigencias de co-factor o pH-óptimo, en propiedades cinéticas, o en energía de activación.

El modificador puede variar en tamaño desde una pequeña molécula a una macromolécula, y su interacción con una molécula enzimática puede ser reversible o irreversible dependiendo de si la asociación inter-molecular es iónica o covalente.

La sensibilidad del ensayo depende entre otros de la afinidad del receptor para el ligante y la capa

5            ciedad del modificador para producir un cambio en la extensión o el modo de actividad enzimática. De preferencia la modificación de la extensión o el modo de actividad enzimática se obtiene con una concentración mínima de modificador. Contra mas próxima es esta concentración a la de la enzima en base molecular, mayor será la sensibilidad del ensayo.

10            De preferencia el modificador será un inhibidor enzimático que, con la interacción con una enzima, inhiba su actividad. El modo de acción del inhibidor puede ser competitivo, no competitivo, incompetitivo, alosterico o una combinación de dos o mas de estos modos. De preferencia el inhibidor debe tener una constante de inhibición (concentración de inhibidor necesaria para el 50% de inhibición del sistema enzimático) inferior a  $10^{-3}$  moles/l, dependiendo del ensayo llevado a cabo.

15            Mas preferentemente la constante de inhibición se encuentra entre  $10^{-15}$  y  $10^{-5}$ .

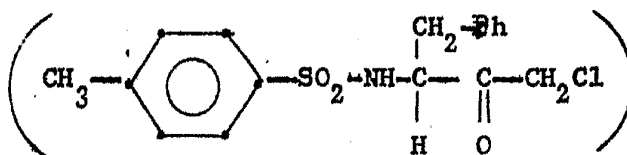
20            En el ensayo puede utilizarse cualquier enzima siempre que exista un modificador que modifique específicamente la actividad enzimática en la forma anteriormente descrita. Las enzimas de elección son estables, se obtienen fácilmente con bajo costo y tienen un número de ciclo elevado y un sistema de ensayo sencillo de llevar a cabo. De preferencia el número de ciclo (moléculas de producto formado por moléculas de enzima en un minuto) es superior a 100 dependiendo de la prueba específica llevada a cabo. Mas preferentemente, el número de ciclo es tan elevado como sea posible y por lo menos de 200.

25            Los sistemas modificadores de enzima que son particularmente apropiados para el presente invento son dihidrofolato-reductasa/metotrexato, dihidrofolato-reductasa/4-aminopterina, dihidrofolato-reductasa/otros

30

inhibidores específicos de esta enzima; beta-glucor-  
ronidasa/ácido 4-deoxi-5-amino-glucárico y sus derivados; -  
biotina conteniendo enzimas/avidina como carboxilasa/avidina;  
quimotripsina/TPCK

5



10

gamma-cistationasa/propargilglicina; alanina-racemasa/tri-  
fluoroalanina; triptofanasa/trifluoroalanina; triptofan-sin-  
tetasa/trifluoroalanina; beta-cistationasa/trifluoroalanina;  
piruvato-glutamato-transaminasa/trifluoro-alanina; oxidasa  
de ácido láctico/ácido 2-hidroxi-3-butínoico; monoamina-oxi-  
dasa/N,N-dimetil-propargil-amina; y diamina-oxidasa/H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-  
C≡CCH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>;

15

La determinación de la actividad enzimática puede llevarse a cabo mediante el control directo o indirecto del consumo de substrato o producción de producto a pH apropiado y temperatura utilizando sistemas de detección que incluyen colorimetría, espectrofotometría, fluoroespectro-  
20 fotometría, gaseometría, termometría (producción de calor),  
cuenta de escintilación.

25

Para aumentar la sensibilidad del sistema es posible utilizar técnicas de bioluminiscencia y de ciclo enzimático; por ejemplo las técnicas descritas por J. Lee y col en Liquid Scintillation Counting: Recent Developments, Stanley P.E. and Scoggins, B.A., Academic Press, New York p. 403 and Lowry O.H. y col en J. Biol Chem 236, p.2746-2755.

30

En una modalidad del presente invento puede utilizarse un ligante señalado para la determinación de -

la presencia de un ligante en una muestra desconocida mediante la adición simultánea o secuencial del ligante señalado y la muestra desconocida a un medio acuoso, a un pH apropiado, conteniendo un receptor específico para el ligante y  
5 ligante señalado. Después de un período de incubación apropiado la distribución del receptor enlazado al ligante y ligante señalado se determina mediante la adición de enzimas y substratos. El receptor que es específico para el ligante enlaza también el ligante señalado y, de este modo, -  
10 reduce la interacción entre el modificador y la enzima disminuyendo así la modificación de la actividad enzimática. La adición de ligante al ensayo resulta en competición con el ligante señalado para enlazar con el receptor y aumenta por tanto la concentración del ligante señalado libre en el ensayo.  
15

La interacción entre ligante-modificador y enzima se aumenta y se afecta una vez más la actividad enzimática. La modificación de la actividad enzimática es por consiguiente una función de la concentración de ligante en el ensayo y es causada por el desenlace del ligante señalado.  
20

Por consiguiente, las diferencias entre la actividad enzimática resultante y la obtenida en la ausencia de ligante es indicativa de la concentración de ligante en la muestra desconocida.

25 Una de las mayores ventajas de este método es que resulta innecesaria la separación de las fracciones enlazadas y libres en el procedimiento. Sin embargo ello no impide el empleo de una etapa de separación de este tipo en el ensayo después de la incubación de ligante y ligante señalado con receptor y antes de la estimación de  
30 la actividad enzimática. La separación de fracciones pue-

de ser deseable en algunos casos para la separación de sub-  
stancias en la muestra que puede interferir con el ensayo en  
zimático. La separación puede obtenerse utilizando cualquie-  
ra de las muchas técnicas descritas para radioinmunoensayo  
5 incluyendo filtración de gel, absorción y cromatografía de  
intercambio iónico, precipitación fraccionada, fase sólida  
y electroforesis.

Evidentemente este ensayo no se limita a  
la determinación de haptenos y antígenos como el ligante -  
10 sino que puede adaptarse también a la identificación y me-  
dición de anticuerpos como el ligante.

Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo,  
señalando el anticuerpo con un modificador de enzima y mi-  
diendo la extensión de la modificación de actividad enzimá-  
15 tica siguiendo la incubación del anticuerpo señalado y anti-  
cuerpo de muestra con una concentración limitadora de anti-  
geno o hapteno. La modificación de la actividad enzimática  
se refiere a la concentración del anticuerpo de muestra.  
Cuando sea necesario las fracciones enlazadas y libres pue-  
20 den separarse antes de la adición de la enzima y del subs-  
trato.

El invento permite también para la determi-  
nación de un ligante el empleo de un receptor señalado en  
lugar de un ligante señalado. El ligante en la muestra des-  
25 conocida reacciona con receptor en exceso señalado con un  
modificador enzimático y, después de la incubación, se adi-  
ciona ligante insolubilizado en fase sólida en exceso y reac-  
ciona con el receptor señalado libre restante. Después de la  
separación de la fase sólida se mide la modificación de la  
30 actividad enzimática asociada con el ligante soluble y se  
relaciona con la concentración de ligante.

Los reactivos del presente invento pueden utilizarse también en una técnica de "sandwich" siempre que el ligante posea por lo menos dos puntos ligantes. El ligante reacciona con receptor de fase sólida en exceso y después de incubación seguida de lavado, se hace reaccionar el receptor de fase sólida enlazado con ligante con receptor en exceso señalado con un modificador enzimático. El receptor señalado libre se separa mediante lavado y se determina la extensión de la modificación de enzima en las fracciones separadas. Esto da luego un índice de concentración de ligante.

Los ejemplos siguientes ilustran el invento.

EJEMPLO 1

Preparación de "amino-digoxina"

A una suspensión de 156 mg (0,2 mmol) de digoxina en 5 cc de etanol absoluto se adicionaron 10 cc de metaperyodato sódico 0,2 M con agitación. Se volvió homogénea la mezcla después de 10 minutos y luego se formó lentamente un precipitado.

Al cabo de 2 horas se adicionaron 5 cc de agua mas 5 cc de etanol. Después de otros 30 minutos se adicionaron 122 microlitros (2,2 mmol) de etilenglicol y empezó a formarse inmediatamente un denso precipitado blanco.

Después de 80 minutos de agitación se adicionaron 133 microlitros (2,0 mmol) de etilendiamina y el pH resultante de 11,0 se ajustó a 9,5 con HCl 0,1 M y se dejó reposar la mezcla reaccional a la temperatura del ambiente durante 18 horas. Durante este tiempo no se modificó el pH.

Luego se adicionaron 141,5 mg (4,0 mmol) de borohidruro sódico y se agitó la mezcla durante 3 horas y me

dia. Luego se ajustó el pH de 10,5 a 6,5 con ácido fórmico IM (alrededor de 3 cc) y la CCD de esta mezcla mostró - una sola mancha principal con un Rf 0,15 (sílice sobre aluminio revelado en butanol: ácido acético: agua/4:1:1).

5 La digoxina mostró un RF 0,7 cuando se reveló en el mismo sistema.

Se evaporaron los disolventes hasta casi sequedad en un evaporador giratorio bajo vacío utilizando un baño de agua a 60°. Se separaron los últimos pocos cc de agua mediante la adición de etanol al 95% (3 x 20 cc) y se repitió la evaporación como antes.

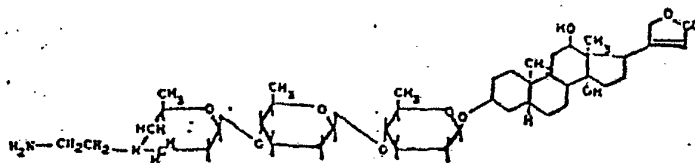
10 El sólido amarillo pálido resultante se extrajo tres veces con etanol absoluto y estos extractos combinados se concentraron hasta alrededor de 4 cc y se centrifugaron para separar una pequeña cantidad de sal que se descartó.

15 La solución sobrenadante de color amarillo pálido se evaporó hasta sequedad bajo una corriente de nitrógeno seco, lo que dió un aceite amarillo que mostró el mismo Rf en CCD - como la mezcla reaccional tal como se ha descrito antes.

20 El producto mostró contener un grupo amino libre haciendolo reaccionar con "fluran" (4-fenilspiro /fluran-2(3H), 1'-ftalan/-3,3'-diona) para formar un compuesto intensamente fluorescente. El producto exhibió un espectro en ácido sulfúrico concentrado similar al de la digoxina con picos de absorción a 385 y 495 milimicras. El producto exhibió también una fuerte afinidad para antisuero (conejo) específico para digoxina. La estructura mas probable del producto aislado es como sigue:

30

---



5

EJEMPLO 2

Preparación de conjugado de metotrexato-aminodigoxina

10

Se disolvieron 11 mg de metotrexato en 5 cc de  $\text{H}_2\text{O}$  y se ajustó a pH 6,5. Se disolvieron 10 mg de "ami-  
nodigoxina" en esta solución y se ajustó el volumen a 20  
cc con  $\text{H}_2\text{O}$ . Se reajustó el pH a 6,5 y se adicionaron a la  
mezcla reaccional 484 mg de clorhidrato de N-etil-N''-(3-di-  
metil-amino)propil-carbodiimida, disuelto en 5 cc de  $\text{H}_2\text{O}$ .

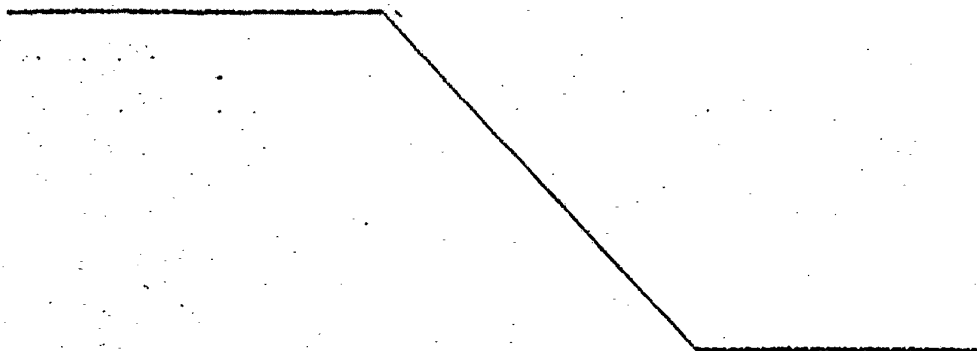
15

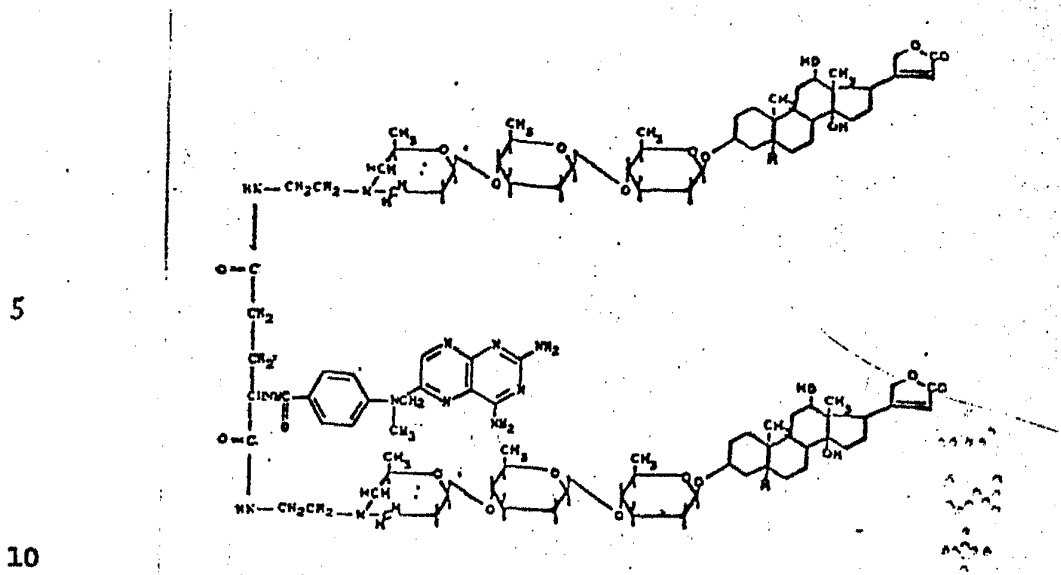
Se purificó el conjugado sobre una columna de gel de sili-  
ce, utilizando citrato amónico al 3% como disolvente. Se  
combinaron las fracciones conteniendo el producto deseado y  
mostraron tener la doble capacidad de ligar fuertemente an-  
tisueru (conejo) específico para digoxina y también inhibir

20

fuertemente la dihidrofolato-reductasa enzimática (hígado de  
gallina). La estructura mas probable del conjugado metotrexa-  
to-aminodigoxina es como sigue:

25





EJEMPLO 3.

Inmunoensayo inhibitor enzimático para digoxina

15 Se incubaron 100 microlitros de suero a 30°C durante 15 minutos con 100 microlitros de solución anticuerpo de antidigoxina, 100 microlitros de solución de NADPH, 100 microlitros de solución de 2-mercaptoetanol y 550 microlitros de tampón de fosfato sódico pH 7,5.

20 Se adicionaron 100 microlitros de conjugado de metotrexato-digoxina del ejemplo 2 (70 microgramos/cc) y se incubó la mezcla durante 15 minutos, después de lo cual se adicionaron 100 microlitros de solución de dihidrofolato-reductasa. La preparación de la dihidrofolato-reductasa utilizada se aisló de hígado de gallina siguiendo el método de Kaufman, B.T., & Gardiner, R.C., Journal of Biological Chemistry, Vol. 211, 25 P 1319 (1956).

30 Se incubó la mezcla durante otros 3 minutos y se determinó la actividad enzimática con la adición de 100 microlitros de solución de dihidrofolato y se controló a 340 nm con un espectrofotómetro de registro. Los resultados se exponen en la Tabla.

TABLA I

Reactivos				Actividad enzimática	
Digoxina (concentración de muestra)	Anticuerpo anti-digoxina	Conjugado de metotrexato-digoxina (en ensayo)	Componentes de ensayo enzimático	DO/min	% de inhibición
5					
10					
	ausente	0	Presente	0,150	0
	ausente	7 ng	presente	0,100	33
	presente	7 ng	presente	0,145	3
	presente	7 ng	presente	0,125	16
15	presente	7 ng	presente	0,115	23

Los reactivos se adicionaron en la secuencia antes descrita.  
DO = densidad óptica.

Es evidente a partir de los resultados anteriores que pocos ng de digoxina en el suero pueden determinarse en el sistema descrito.

EJEMPLO 4

Preparación de conjugado de metotrexato-albúmina de suero humano

Se dividieron 45 mg de metotrexato en 1,0 cc de N,N-dimetil-formamida y se adicionaron 25 mg de N-hidroxisuccinimida.

Se disolvieron 41 mg de N,N-diciclohexil-carbodiimida y se mantuvo la mezcla a la temperatura del ambiente durante 13 horas. Se separó por filtración el subproducto de urca insoluble y se adicionaron 100 microlitros del

filtrado a una solución conteniendo 5 ng de albúmina de suero humano en 800 microlitros de tampón de fosfato sódico 0,1M pH 7,5 mas 100 microlitros de dioxano. Esta mezcla reaccional se mantuvo a la temperatura del ambiente durante 30 minutos y luego se cargó en una columna Sephadex G-25 equilibrada con tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 7,5. La columna se reveló con este tampón y se obtuvieron dos picos de elución conteniendo metotrexato, el primero de los cuales contuvo el conjugado de metotrexato-albúmina de suero humano.

EJEMPLO 5.

Inmunoensayo inhibidor de enzima para albúmina de suero humano.

Se incubó a 30°C durante 15 minutos 100 microlitros de suero diluido con 100 microlitros de anticuerpo de albúmina de suero antihumano (conejo) en solución. Se adicionaron 100 microlitros de solución de NADPH, 100 microlitros de solución de 2-mercaptoetanol y 550 microlitros de tampón de fosfato sódico pH 7,5. Se adicionaron 100 microlitros de conjugado de metotrexato-albúmina de suero humano y se incubó la mezcla durante 15 minutos, después de los cual se adicionaron 100 microlitros de solución de dihidrofolato-reductasa. Se incubó la mezcla durante 3 minutos mas y se determinó la actividad enzimática mediante la adición de 100 microlitros de solución de dihidrofolato y se controló a 340 nm con un espectrofotómetro de registro varian. Los resultados se exponen en la Tabla II.

30

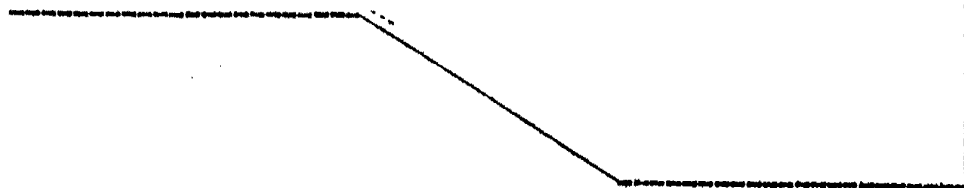


TABLA II

Reactivos				Actividad enzimática		
5	Albúmina de suero humano (conc. - de muestra)	Anticuerpo de albúmina de suero antihumano	Conjugado de metotrexato albúmina de suero humano	Componentes de ensayo enzimático	DO/min	% de inhibición
10	0	ausente	0	presente	0,123	0
	0	ausente	0,8 ug	presente	0,068	45
	0	presente	0,8 ug	presente	0,105	16
	5 ug/ml	presente	0,8 ug	presente	0,092	25
15	10 ug/ml	presente	0,8 ug	presente	0,085	31

De los resultados anteriores resulta evidente que unos pocos microgramos de albúmina de suero humano pueden determinarse en el sistema descrito.

20

EJEMPLO 6

Síntesis de conjugado de metotrexato-aminoetilmorfina.

a) Síntesis de O<sup>3</sup>-aminoetilmorfina

25

En 10 cc de tetrahidrofurano (THF) recién destilado de hidruro de litio-aluminio (LAH) se suspendieron 400 mg de LAH bajo nitrógeno. Se adicionaron durante 5 minutos una solución de 400 mg de morfina y 400 mg de cloroaceto nitrilo en 4 cc de THF recién destilado, seguido de reflujo durante 1 hora. Se dejó la mezcla que se enfriara y se adicionaron 0,6 cc de agua seguido de 0,6 cc de 10 % en peso de hidróxido sódico y 2 cc de agua. Después de filtrar la mezcla se lavaron las sales con THF, se combinaron las fracciones de THF, se secaron con sulfato de magnesio

30

bajo nitrógeno, se filtró y se evaporó el filtrado, lo que dió 380 mg de O<sup>3</sup>-aminoetilmorfina.

b) Síntesis de alfa-benciléster de ácido N-t-butoxicarboxil-gamma-(O<sup>3</sup>-aminoetilmorfina) glutámico.

5 Se agitó durante 4 horas a la temperatura del ambiente una mezcla de O<sup>3</sup>-aminoetilmorfina, (50 mg preparado tal como se ha expuesto anteriormente), éster alfa-bencilico de ácido N-t-BOC-glutámico (34 mg) y dicitohexil carbodiimida (25 mg) en diclorometano (5 cc). Se diluyó la  
10 mezcla con acetato de etilo y se lavó con solución de carbonato sódico diluida. Luego se extrajo la solución de acetato etílico por dos veces con ácido clorhídrico 0,1 N, y se trataron los extractos ácidos combinados con suficiente -  
15 solución de hidróxido sódico al 10% en peso hasta ajustar el pH a 8,0. Se extrajo la solución dos veces con acetato de etilo y el acetato etílico combinado extraído se lavó con salmuera, se secó (sulfato sódico anhidro) y se evaporó hasta obtener un aceite incoloro (36 mg).

c) Síntesis de ácido trifluoroacético de éster bencilico de ácido gamma-(O<sup>3</sup>-aminoetilmorfina)-alfa-glutámico.  
20

Se agitó a la temperatura del ambiente una solución de derivado de ácido N-t-BOC-glutámico-morfina (36 mg, preparado como se ha descrito anteriormente) en dicloro-  
25 metano (3 cc) y se adicionó ácido trifluoroacético (1 cc). Se agitó la mezcla durante 15 minutos y luego se evaporó hasta sequedad. El residuo resultó un cristal incoloro (40 mg).

d) Síntesis de éster metotrexato-gamma-(O<sup>3</sup>-aminoetilmorfina)-alfa-bencilico.

30 Una solución de ácido 4-amino-4-deoxi-N<sup>10</sup>-metilptericoico (37 mg) en 3 cc de sulfóxido de dimetilo (DMSO)

agitándose a la temperatura del ambiente se trató con trietilamina (28 microlitros) e *i*-butil-cloroformato (25 microlitros) y se agitó la mezcla durante 30 minutos. Luego se adicionó a una mezcla del derivado de morfina (75 mg preparado como se ha descrito en c) y trietilamina (28 microlitros) en DMSO (2 cc) y se agitó la mezcla a 60° durante una hora. Se diluyó la mezcla enfriada con agua y se extrajo por dos veces con acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo combinados se lavaron con agua y luego se extrajeron dos veces con ácido clorhídrico 0,1N. Se trataron los extractos ácidos combinados con suficiente hidróxido sódico al 10% en peso para elevar el pH a 8,0. Se extrajo la mezcla por tres veces con acetato de etilo y los extractos combinados se lavaron con salmuera, se secaron (sulfato sódico anhidro) y se evaporaron, lo que dió un aceite amarillo (15 mg). Este se purificó utilizando cromatografía de capa delgada preparatoria (CCD) sobre gel de sílice revelándose con cloroformo/metanol, 4:1. El compuesto deseado se obtuvo como un sólido amarillo (4 mg).

e) Síntesis de metotrexato- $\gamma$ -(O<sup>3</sup>-amidoetil morfina).

Se mezcló el producto preparado como se ha descrito en d (4mg) con solución de hidróxido sódico 0,1N (5 cc) y se agitó la mezcla a la temperatura del ambiente durante 8 horas resultando una solución de color amarillo claro.

A ello se adicionó ácido clorhídrico 0,1N (5 cc) y se completó la mezcla hasta 25 cc con tampón de ortofosfato sódico (0,05 M, pH 7,4), lo que dió una solución del compuesto deseado apropiada para utilizarse en el ensayo enzimático.

EJEMPLO 7.

Immunoensayo inhibidor enzimático para morfina

Se incubó durante 20 minutos a 37° una mezcla de 10 microlitros de solución de morfina de concentración - apropiada, 50 microlitros de solución de metotrexato-gamma-  
 5 -(O<sup>3</sup>-amidoetilmorfina) (4 ng/25 cc), 50 microlitros de solu-  
 ción de anticuerpo de antimorfina, 10 microlitros de NADPH,  
 10 microlitros de solución de 2-mercaptoetanol, 50 microlitros de solución de cloruro potásico, 150 microlitros de solu-  
 10 ción tampón tris-HCL (pH 7,5) conteniendo EDTA y 10 microlitros de solución de dihidrofolato-reductasa (E. casei).  
 La actividad enzimática en la mezcla se determinó después de la adición de 10 microlitros de solución de dihidrofolato con-  
 trolando el cambio en la extinción de la solución a 340 nm -  
 15 utilizando un analizador centrífugo Centrifichem.  
 Los resultados se exponen en la Tabla III.

TABLA III

REACTIVOS				ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	
MORFINA microgr <sub>a</sub> mo/ensa- yo	ANTICUER PO DE AN TIMORFI- NA	CONJUGADO DE MORFI- NA-METO- TREKATO	COMPONEN TES DE - ENSAYO - ENZIMATI CO	DO/MIN.	% de INHI- BICION
0	ausente	ausente	presente	0,54	0
0	ausente	3x10 <sup>-8</sup> M	presente	0,14	76
0	presente	3x10 <sup>-8</sup> M	presente	0,41	29
0,04	presente	3x10 <sup>-8</sup> M	presente	0,37	36
0,40	presente	3x10 <sup>-8</sup> M	presente	0,35	40
4,0	presente	3x10 <sup>-8</sup> M	presente	0,31	46
20	presente	3x10 <sup>-8</sup> M	presente	0,27	54
40	presente	3x10 <sup>-8</sup> M	presente	0,23	60

La tabla anterior muestra que aumentando la concentración de morfina se produce una disminución de la actividad de la dihidrofolato-reductasa. De este modo pueden ensayarse soluciones de morfina conteniendo de 4 microgramos por cc a 4 mg por cc de morfina en donde solo se encuentre disponible 10 microlitros de la solución.

Sin embargo con ello no se pretende indicar que ello constituye la gama requerida, sino solo que puede utilizarse con éxito.

10 EJEMPLO. 8

Síntesis de conjugado de ferritina-metotrexato.

Se agitó a la temperatura del ambiente una solución de ferritina de hígado humano (1,3 mg) en tampón de fosfato sódico (0,05 M, pH 8,0, 5 cc) y 1 cc de dimetil-formamida (DMF) y se adicionó una solución obtenida tratando a la temperatura del ambiente durante 30 minutos, metotrexato (23 mg) en DMF (2 cc) con trietilamina (21 microlitros) y i-butilclorofornato (15 microlitros).

Se agitó la mezcla a la temperatura del ambiente durante 2 horas y luego se dializó frente a 2x2 litros de tampón de ortofosfato sódico (0,05 M, pH 7,4 conteniendo cloruro sódico 0,1 M y azida sódica 0,05 % en peso) durante 24 horas. Luego se paso la solución a través de una columna de Sephadex G-25 equilibrada con el mismo tampón y las fracciones conteniendo ferritina combinadas y se completo hasta 10 cc con el tampón.

La solución resultante es apropiada para utilizarse en un inmunoensayo enzimático para la determinación de ferritina.

REIVINDICACIONES

Descrito el objeto del presente inven  
to se declaran nuevas y de propia invención las siguientes  
reivindicaciones:

5                   1.- Método para determinar un mate-  
rial inmunológicamente activo en una muestra, caracteri-  
zado porque se pone en contacto la muestra con un reacti-  
vo que comprende el material inmunológicamente activo o  
un receptor que puede enlazar específicamente dicho ma-  
10                   terial inmunológicamente activo, señalado con una substancia  
capaz de modificar la extensión o el modo de actividad  
de una enzima.

                  2.- Método de conformidad con la rei-  
vindicacion 1, caracterizado porque la muestra se pone  
15                   en contacto con un receptor que puede enlazar específica-  
mente el material inmunológicamente activo, con el mate-  
rial inmunológicamente activo señalado con una substancia  
capaz de modificar la extensión o el modo de la activi-  
dad de una enzima, y con una enzima y un substrato enzi-  
20                   mático, y porque la extensión o el modo de la actividad  
enzimática resultante se mide y compara con la obtenida  
con un standard.

                  3.- Método, de conformidad con la rei-  
vindicacion 1, caracterizado porque la mezcla se pone en  
25                   contacto con un receptor que puede enlazar específicamen-  
te el material inmunológicamente activo y que se señala  
con un substrato capaz de modificar la extensión o el mo-  
do de actividad de una enzima, con el material inmunoló-  
gicamente activo en forma insolubilizada, y con una enzi-  
30                   ma y un substrato enzimático, y porque la extensión o el  
modo de actividad enzimática después de la separacion de  
la fase sólida se mide y compara con la obtenida con un

estandard.

4.- Método, de conformidad con la reivindicación 1 o 3 caracterizado porque la substancia capaz de modificar la actividad de una enzima es un inhibidor de enzima.

5

5.- Método, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el receptor es un anticuerpo.

6.- Método, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el inhibidor es un inhibidor de la dihidrofolato-reductasa enzimática.

10

7.- Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 caracterizado porque el inhibidor es metotrexato y la enzima es dihidrofolato-reductasa.

15

8.- Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el material inmunológicamente activo es un hapteno.

9.- Método, de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque el hapteno es digoxina y el receptor es un anticuerpo frente a digoxina.

20

10.- Método de conformidad con la reivindicación 8 caracterizado porque el hapteno es morfina y el receptor es un anticuerpo frente a morfina.

25

11.- Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el material inmunológicamente activo es una proteína.

12.- Método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque la proteína es albúmina de suero humano y el receptor es un anticuerpo frente a albúmina de suero humano.

30

13.- Método para determinar un material inmunológicamente activo en una muestra.

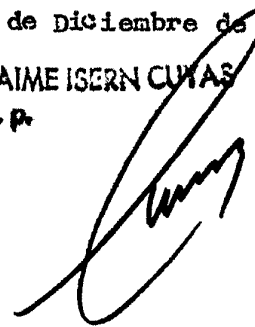
Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 29 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 1 de Diciembre de 1978

p.a.

JAIME ISERN CUYAS

P.P.



mc.

1978  
12  
1  
1