



ESPAÑA

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 AI
	21	481.208/5
	22 FECHA DE PRESENTACION	
		1-JUNIO-1979

PATENTE DE INVENCION

50 PRIORIDADES:		
51 NUMERO	52 FECHA	53 PAIS
911.865	2-6-79	ESTADOS UNIDOS
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G01N 33/16	
54 TITULO DE LA INVENCION		
" UN METODO PARA DETECTAR ANTICUERPOS "		
57 SOLICITANTE (S)		
AMERICAN HOSPITAL SUPPLY CORPORATION		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
One American Plaza, Evanston, Illinois 60201, Estados Unidos.		
52 INVENTOR (ES)		
DELFIN F. RIPPE.		
53 TITULAR (ES)		
54 REPRESENTANTE		
DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU		

CM.-

POOR
QUALITY

1 Se describe un método para detectar anticuerpos
frente a ácido desoxirribonucleico natural (n-DNA), anticuer-
pos anti-núcleos, anticuerpos frente a proteínas que no con-
5 tienen histona, factores reumatoides, anticuerpos frente a
tiroglobulina, y un ensayo inmuno-fluorescente para tal de-
tección. El método comprende la incubación de un conjugado
insoluble de albúmina de suero bovino metilada (mBSA)-ácido
desoxirribonucleico natural (n-DNA) u otros sustratos con sue-
ro de pacientes con lupus eritematosus sistémico (SLE) u
10 otras enfermedades autoinmunes durante un periodo de tiempo
suficientemente largo, el lavado del precipitado o flocula-
do, la separación y descartado del mismo del fluido que so-
brenada, la adición de un anticuerpo anti-inmunoglobulina
marcado con fluoresceína al floculado lavado y la incubación
15 de la mezcla marcada durante un periodo lo suficientemente
largo, lavado del floculado incubado y separación del mismo
del fluido sobrenadante, la suspensión de la pasta en un me-
dio líquido para determinar la fluorescencia del floculado,
la cual es proporcional a la concentración de anticuerpos
20 frente al ácido desoxirribonucleico y otras muestras en el
suero. El conjugado insoluble de albúmina de suero bovino me-
tilada (mBSA)-ácido desoxirribonucleico natural (n-DNA) retie-
ne la forma de doble hélice del ácido desoxirribonucleico na-
tural (n-DNA).

25 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Esta invención se refiere e ensayos inmunofluo-
rescentes y, más particularmente, a un ensayo inmunofluores-
cente indirecto en fase sólida (SPIIF) para la detección de
anticuerpos humorales frente al ácido desoxirribonucleico na-
30 tural (n-DNA).

1 El empleo de albúmina del suero bovino metilada
(mBSA) como vehículo para el ácido nucleico con fines de in-
munización, se conoce ya desde hace una década (Flescia y
otros Proc. Nat. Acad. Sci. 52, p. 279, 1964). La albúmina
5 de suero bovino metilada (mBSA) se ha utilizado también en
procedimientos de fraccionamiento para la purificación de
ácido nucleico (Mandell y Hershey, Analytical Biochemistry 1,
p. 66, 1960).

10 La formación de los conjugados de ácido desoxirri-
bonucleico (DNA)-albúmina de suero bovino metilada fueron
descritos por primera vez por Flescia y otros (Proc. Nat.
Acad. Sci. 52, p. 279, 1964). El primer objeto de estos in-
vestigadores fue promover anticuerpos frente a DNA desnatura-
lizado (una hélice) y para conjugados insolubles mBSA-poli-
15 nucleotidos más pequeños.

Hasta la presente invención, no se ha utilizado
un precipitado (es decir, un conjugado) de albúmina de suero
bovino metilada (mBSA)-ácido desoxirribonucleico natural (n-
DNA) como sustrato para detectar anticuerpos frente a n-DNA.
20 En vez de esto, las autoridades han aconsejado no emplear
conjugados mBSA-n-DNA para inmunizaciones. Como ha sido se-
ñalado por Flescia y otros (Proc. Nat. Sci. 52, p. 279, 1964),
"La mezcla de mBSA con DNA natural da lugar a la formación de
un coágulo fibroso, compacto, que es virtualmente imposible
25 de inyectar".

Los medios convencionales utilizados para detec-
tar anticuerpos frente a DNA natural incluyen radioinmunoen-
sayos (RIA) y ensayos de aglutinación de latex. Sin embargo,
el primer método es bastante caro y consume demasiado tiem-
30 po y el último es poco sensible.

1 Con objeto de superar estas desventajas se necesitaba un método barato y sensible que no consuma tiempo. Este método es el proporcionado por la presente invención tal como se señala y describe a continuación.

5 RESUMEN DE LA INVENCION

 El método presente de detectar y/o determinar cuantitativamente anticuerpos anti-ácido desoxirribonucleico natural (n-DNA) y otros, en suero de varios pacientes específicamente afectados, comprende las siguientes etapas:

- 10 A. incubación de un conjugado insoluble de albúmina bovina metilada (mBSA)-ácido desoxirribonucleico natural (n-DNA) con el suero de un paciente con lupus erythematosis sistémico (SLE) durante un período de tiempo suficiente;
- 15 B. lavado de dicha mezcla floculada de suero y separación de la misma del fluido sobrenadante;
- 20 C. adición de un anticuerpo anti-inmunoglobulina marcada con fluoresceína al floculado lavado e incubación de la mezcla marcada durante un período de tiempo suficiente;
- 25 D. lavado de dicho floculado incubado y separación del mismo del fluido sobrenadante; y
- 30 E. suspensión de la pasta de mezcla de anticuerpo en un medio de lavado y determinación de la fluorescencia del floculado, la cual es proporcional a la concentración de dichos anticuerpos frente a dicho ácido desoxirribonucleico (DNA).

1

Según la presente invención, los anticuerpos anti-DNA son detectados por un ensayo inmunofluorescente indirecto en fase sólida que comprende un conjugado estable e insoluble de BSA metilada y ácido desoxirribonucleico natural de doble hélice (n-DNA).

5

Se pueden preparar otros conjugados insolubles mezclando inmunoglobulina G (IgG) de conejo, tiroglobulina humana o un extracto de nucleos de timo de ternera (CTE) con BSA metilada. Estos conjugados insolubles se utilizan como sustratos para la detección de factores reumatoides, anticuerpos anti-tiroglobulina y anticuerpos anti-núcleos, respectivamente, en el suero de pacientes que sufren de enfermedades autoinmunes.

10

DESCRIPCION DE LOS ASPECTOS PREFERIDOS

15

El presente método emplea un conjugado estable, insoluble, de albúmina de suero bovino metilada (mBSA)-ácido desoxirribonucleico natural (n-DNA) en ensayos inmunofluorescentes indirectos en fase sólida para la detección de anticuerpos frente a ácido desoxirribonucleico natural (n-DNA).

20

Según un aspecto de la presente invención, se incuban cantidades iguales del conjugado de albúmina de suero bovino metilada (mBSA)-ácido desoxirribonucleico natural (n-DNA) y el suero de un paciente con lupus erythematosus sistémico (SLE) durante un periodo de tiempo suficientemente largo. La mezcla incubada se lava despues con una solución y se separa de la misma el fluido sobrenadante. Despues, se añade un anticuerpo anti-inmunoglobulina, marcado con fluoresceina, al floculado lavado y la mezcla marcada se incuba durante un periodo de tiempo suficiente. Se lava despues el floculado incubado y se separa del mismo el fluido sobrena-

25

30

1 dante.

5 Se suspende una pasta de la mezcla de anticuerpo en un medio de lavado y se determina la fluorescencia del floculado a 490/520 nm por excitación y emisión, respectivamente, Ya que la fluorescencia del floculado es proporcional a la concentración de anticuerpos frente al ácido desoxirribonucleico natural (n-DNA), estos anticuerpos (n-DNA) pueden detectarse.

10 La mezcla incubada puede lavarse con un medio de lavado tal como albúmina que contiene solución salina con tampón de fosfato (PBS). Se marca el anticuerpo anti-inmoglobulina (anti-inmunoglobulina G o anti-inmunoglobulina M) con un agente fluorescente tal como isotiocianato de fluoresceína.

15 Los valores de fluorescencia obtenidos para el suero procedente de un paciente con lupus erythematosis sistémico (SLE) se comparan con los valores de fluorescencia de una línea de base para el suero de control normal. La diferencia de fluorescencia de los sueros proporciona la base para la determinación de los anticuerpos frente al ácido deoxirribonucleico natural (n-DNA) en el suero de lupus erythematosus sistémico (SLE).

25 El ensayo empleado para detectar anticuerpos en un suero es un ensayo inmunofluorescente indirecto en fase sólida que comprende un conjugado estable e insoluble obtenido a partir de un polímero soluble seleccionado del grupo que consiste en ácido desoxirribonucleico natural de doble hélice (n-DNA), inmunoglobulina G de conejo (IgG), tiroglobulina humana, y un extracto de nucleos de timo de ternera insolubilizado con albúmina metilada de suero bovino (mBSA).

30

1 Según la presente invención, cuando el polímero
soluble es ácido desoxirribonucleico natural (n-DNA), el en-
sayo es para detección de anticuerpos frente a ácido desoxi-
5 rribonucleico natural (n-DNA) en lupus erythematosus sistémi-
co.

 En otro ensayo en el cual el polímero soluble es
inmunoglobulina G de conejo (IgG), se utiliza el ensayo para
detectar anticuerpos frente a inmunoglobulina G (IgG) tal co-
mo sucede con la artritis reumatoide. Cuando el polímero so-
10 luble es tiroglobulina humana, el ensayo se emplea para de-
tectar anticuerpos frente a tiroglobulina en la tiroiditis
autoinmune. El extracto de nucleos de timo de ternera inso-
lubilizado se emplea para detectar anticuerpos anti-núcleos.

 Según el presente ensayo, se pueden utilizar
15 otros materiales solubles con la albúmina de suero bovino me-
tilada (mBSA) para formar el conjugado insoluble necesario
para la detección de anticuerpos frente a antígenos en varias
enfermedades. Estos materiales solubles incluyen albúmina me-
tilada de suero humano (mHSA) y un extracto de nucleos celu-
20 lares soluble tal como Antígeno Nuclear Extraíble (ENA), pa-
ra diagnóstico de enfermedades de tejido conjuntivo mixto.

 En el conjugado insoluble la albúmina metilada
de suero bovino (mBSA) puede ser sustituida en la insolubi-
lización de polímeros solubles (por ej. n-DNA). Se ha visto
25 que cuando la albúmina metilada de suero humano (mHSA) sus-
tituye a la albúmina metilada de suero bovino (mBSA), se ob-
tienen excelentes conjugados. Hay muy poca diferencia en la
detección de anticuerpos cuando se emplea albúmina metilada
de suero humano (mHSA) para insolubilizar los polímeros solu-
30 bles.

1 El precipitado insoluble, es decir, conjugado,
de albúmina metilada de suero bovino-ácido desoxirribonuclei-
co natural (n-DNA) retiene la forma de doble hélice de la
n-DNA original, tal como se demuestra por un análisis de la
5 fluorescencia de una muestra del precipitado, realizado se-
gún el método de Morgan y Pulleyblank (BioChem. Biophys. Res.
Communications 6, 1974, p. 346).

El precipitado mBSA-n-DNA (es decir conjugado)
se comporta en el ensayo de forma similar al ácido desoxirri-
10 bonucleico natural (n-DNA) antes de su incolubilización. Es
decir, que el conjugado retiene propiedades fluorescentes a
un pH alto que son características del ácido desoxirribonu-
cleico natural de doble hélice (n-DNA).

Además, el conjugado insoluble de albúmina meti-
15 lada de suero bovino o albúmina metilada de suero humano y
un polímero insoluble (por ej., n-DNA) retiene la antigeni-
cidad del polímero soluble. Esto se ha demostrado con expe-
rimentos en los que la adición de DNA soluble inhibe especí-
ficamente la reactividad de sueros de lupus con el floculado
20 insoluble mBSA-DNA. Además al precipitar el mBSA con n-DNA,
por ejemplo, se produce una firma copulación de manera que
no es detectable nada de n-DNA soluble libre en los fluidos
sobrenadantes después de varios lavados. Según esto el con-
jugado (es decir mBSA-n-DNA) es muy estable.

25 Los siguientes ejemplos se dan para ilustrar los
aspectos preferidos y las ventajas de la presente invención.

EJEMPLO 1

Síntesis del conjugado de albúmina de
suero bovino metilada (mBSA)-ácido de
soxirribonucleico natural (n-DNA)

30 Según la presente invención, el conjugado para

1 la detección de anticuerpos frente a ácido desoxirribonuclei-
co natural se prepara como se señala a continuación.

5 Se disuelve el ácido desoxirribonucleico natural
(n-DNA) procedente del timo de ternera; Escherichia coli,
o esperma de salmón en una solución salina con tampón de fos-
fato (PBS) a una concentración de 1,0 mg/ml. Después, la al-
búmina metilada de suero bovino (mBSA) se disuelve en agua a
una concentración de 10 mg/ml. Se mezclan las dos soluciones
en una relación óptima previamente establecida para un máxi-
mo en la precipitación \sphericalangle 700 μ l de mBSA (10 mg/ml) por 1 mg
de n-DNA \sphericalangle , y se incuba a 37°C durante dos horas.

10 Se lava el precipitado con PBS por centrifuga-
ción hasta que no se detecta nada de ácido desoxirribonuclei-
co natural libre (n-DNA) en el fluido sobrenadante descarta-
do. Se suspende la pasta en PBS. Se homogeneiza el floculado
15 utilizando un triturador de tejido de vidrio para obtener
una suspensión más uniforme, y se normaliza la concentración
del floculado empleando un fluorómetro Turner 430 a 490/520
nm (λ excitación/ λ emisión) y a 540/590 nm con bromuro de etan-
20 dium. Se centrifuga la suspensión y se suspende en un volumen
apropiado de PBS suplementado con 5% de BSA. Se divide la
suspensión en partes alicuotas de 5,0 ml y se liofilizan.
Después de reconstituida, se ensaya la suspensión en cuanto
al ácido desoxirribonucleico natural libre (soluble) (n-DNA)
25 por adición de bromuro de ethidium al sobrenadante claro des-
pués de centrifugación. No hay (n-DNA) libre y correspon-
dientemente no se observa potenciación de la fluorescencia
a 540/590 nm.

30 Este conjugado insoluble se prepara para la de-
tección de anticuerpos frente a ácido desoxirribonucleico na-

1 tural (n-DNA) en el suero de pacientes con lupus erythemato-
sus sistémico (SLE).

5 Los conjugados insolubles de inmunoglobulina G
de conejo (IgG)-mBSA, tiroglobulina humana-mBSA, y CTE-mBSA
se preparan esencialmente por el mismo procedimiento que el
señalado antes. Las únicas diferencias son las relaciones óp-
timas de mBSA a IgG, tiroglobulina, o CTE y la adición de
0,2% de glutaraldehído para estabilización del floculado re-
sultante.

10

EJEMPLO 2

Detección de Anticuerpos Anti-ácido de- soxirribonucleico natural (n-DNA)

15

Se incuban en un tubo de ensayo de borosilicato
100 µl de conjugado de albúmina metilada de suero bovino
(mBSA)-n-DNA con 100 µl de una dilución apropiada de suero
(es decir 1:2, 1:4 ó 1:10) de un paciente con lupus arythe-
matusus sistémico (SLE). Se incuba la mezcla durante treinta
minutos a la temperatura ambiente. Se lava la mezcla tres
veces por centrifugación con una solución salina de tampón
fosfato (PBS), esto es, se añaden 4 ml de PBS, y se centrifu-
ga el tubo de ensayo a 2000 xg y se aspira el fluido claro
sobrenadante.

20

25

Se añade anticuerpo anti-inmunoglobulina marca-
da con fluoresceína, 100 µl de una dilución apropiada (es de
cir, 1:400) y se incuba a temperatura ambiente durante 30 mi-
nutos. Se lava dos veces la mezcla floculada de anticuerpo
marcado por centrifugación.

30

Se suspende la pasta de mezcla floculada de an-
ticuerpo en 2,0 ml de PBS y se determina la fluorescencia a
490/520 nm por excitación y emisión respectivamente. Este en

1 sayo fluorométrico se lleva a cabo utilizando un espectro-
fluorómetro equipado con monocromadores, es decir, un fluoró-
metro Turner 430.

5 Los valores obtenidos para el suero de pacientes
con lupus erythematosus sistémicos (SLE) se comparan con una
línea de base para suero normal de control.

EJEMPLO 3

Pruebas de fluoroinmunoensayo

10 El fluoroinmunoensayo como el que se ha descri-
to antes en el Ejemplo 2, se emplea para detectar los anti-
cuerpos frente a n-DNA en el suero de pacientes con lupus
erythematosus sistémico (SLE). Con objeto de detectar apro-
piadamente los anticuerpos en el suero (SLE), se ensaya tam-
bien el suero de pacientes normales.

15 A continuación se da una lista de valores de sue-
ro normal de control, cada uno de diferentes individuo, jun-
to con la desviación media y patrón, que es una medida de la
reproducibilidad del ensayo. Estos datos se obtienen emplean-
do el fluorómetro Turner 430. El suero se diluye 1:4.

20 Fluorescencia del suero de un paciente normal

<u>Número de la muestra</u>	<u>% F 490/520^m</u>
1	0,175
2	0,180
3	0,185
4	0,185
5	0,170
6	0,175
7	0,185
8	0,175

30 media \pm SD = 0,179 \pm 0,006

1 ²El anticuerpo empleado en este ensayo es anti-TgG humana de cabra marcado con fluoresceína.

5 Con objeto de comparar con los anteriores datos, se dan los valores siguientes de la fluorescencia de suero de pacientes SLE. Los valores se obtienen del suero de individuos con lupus erythematosus sistémico (SLE).

Fluorescencia de suero de pacientes SLE

<u>Número de muestra</u>	<u>% F 490/520²</u>
1	0,430
10 2	0,310
3	0,370
4	0,215
5	0,315
6	0,225
15 7	0,335
8	0,485

²El anticuerpo utilizado para este ensayo es anti-IgG humana de cabra marcado con fluoresceína.

20 Como se muestra en las tablas anteriores, hay un aumento específico de fluorescencia en los sueros SLE cuando se comparan con la línea base de los sueros de control normales.

25 A partir de este experimento se puede concluir que el suero de pacientes SLE tiene anticuerpos frente a n-DNA.

EJEMPLO 4

Especificidad del fluoroinmunoensayo en fase sólida de anticuerpos anti-DNA

30 Con objeto de determinar si la reacción que se mide es la de DNA y anticuerpos anti-DNA, se lleva a cabo la

1 inhibición siguiente del experimento de enlace. Se divide
el suero de un paciente con SLE y un control normal en vo-
lúmenes iguales de 100 µl. A cada parte alícuota de suero se
añade 100 µl de una solución que contiene DNA libre (varian-
do entre 0 y 100 µg) y se incuba durante 1 hora a 37°C. Des-
pues, se añaden 100 µl de mBSA-DNA a cada muestra y se lleva
a cabo el ensayo como en el Ejemplo 2.

<u>Muestra de suero</u>	<u>DNA soluble añadido (µg)</u>	<u>% F (490/520)</u>	<u>% Inhibición</u>
Control	0	1,08	NA
	1	1,08	NA
	5	1,10	NA
	10	1,10	NA
	50	0,88	NA
	100	0,84	NA
SLE	0	5,02	0
	1	3,62	35
	5	3,55	37
	10	3,22	45
	50	1,85	79
	100	1,58	86

NA = no aplicable

Se observa la inhibición de anticuerpos de sue-
ros SLE a mBSA-DNA al pre-incubar los sueros con DNA soluble.
El grado de inhibición es proporcional a la concentración
del inhibidor.

EJEMPLO 5

Comparación de la Inmunofluorescencia indirecta en fase sólida (SPIIF) y el Radioinmunoensayo (RIA)

Con objeto de comparar la sensibilidad del pre-
sente fluoroinmunoensayo con la del radioinmunoensayo (RIA),

1 se ha ensayado el suero de diez pacientes SLE empleando el
fluoroimmunoensayo en fase sólida (SPIIF) y un equipo de ra-
dioimmunoensayo (RIA) distribuido por Amersham/Searle. A con-
tinuación se dan los resultados de los ensayos.

5 El radioimmunoensayo (RIA) emplea ácido desoxi-
ribonucleico (DNA) marcado con I^{125} .

<u>Número de muestra</u>	<u>SPIIF (% F)</u>	<u>RIA (% enlace)</u>
1	0	11
2	133	120
10 3	58	88
4	35	58
5	0	2
6	1	0
7	67	113
15 8	10	0
9	130	120
10	62	75

Como se muestra en la tabla anterior, el ensayo
SPIIF es tan sensible como el ensayo RIA.

20 EJEMPLO 6

Detección de Anticuerpos Anti-núcleos em-
pleando un extracto de núcleos de timo de
ternera insolubilizado con mBSA

25 Se purifican núcleos de timo de ternera y se ex-
trae el material nuclear sónicamente a 60 KHZ durante 3 mi-
nutos en tampón de fosfato hipotónico. Se precipita el ex-
tracto de núcleos con mBSA y se lava una vez con una solu-
ción de glutaraldehído al 0,25%. Se utiliza el precipitado
30 como sustrato para detectar los anticuerpos anti-núcleos em-
pleando el método descrito en el Ejemplo 2. Además se iden-
tifican los sueros ANA positivos empleando un recipiente de

1 tapa deslizable que se encuentra en el comercio y la concen-
tración de anticuerpos así determinada se expresa como

	Muestras de suero	Conc. ANA	Inmunofluorescencia en fase sólida	
			Anti-γG	Anti-γM
5	Control	0	0	0
	ANA +			
	1	1:20	29	5
	2	1:80	24	99
	3	1:640	47	38
10	4	1:1280	87	63

Los anticuerpos anti-núcleos de la clase IgG y IgM son detectables empleando el fluoroinmunoensayo en fase sólida. Las muestras de suero muy concentradas presentan proporcionalmente una elevada fluorescencia. En algunos casos (véase muestra 1:80), la titulación obtenida empleando el equipo que se encuentra en el comercio falla al revelar la prevalencia de una clase de anticuerpos (IgM) sobre otra.

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

20 REIVINDICACIONES

1.- Un método para detectar anticuerpos seleccionados del grupo formado por anticuerpos frente al ácido desoxirribonucleico natural de doble hélice, anticuerpos frente a la inmunoglobulina G de conejo, anticuerpos frente a la tiroglobulina humana y anticuerpos frente a los extractos de timo de ternera en suero, que comprende:

25 a) incubar un conjugado insoluble de albúmina metilada de suero de bovino con un antígeno seleccionado del grupo formado por: ácido desoxirribonucleico natural de doble hélice, inmonoglobulina G de conejo, tiroglobulina huma
30

pe

1 na y extractos de timo de ternera con un suero de un pacien-
te durante un periodo de tiempo suficiente, formándose así
un floculado de suero;

5 b) lavar dicha mezcla floculada de suero y separar
de la misma el fluido sobrenadante;

c) agregar un anticuerpo anti-inmunoglobulina marca-
do con fluoresceina al floculado lavado e incubar la mezcla
marcada durante un periodo suficiente de tiempo;

10 d) lavar dicho floculado incubado y separar del
mismo el fluido sobrenadante; y

e) suspender el floculado en un medio de lavado y
determinar la fluorescencia del mismo, que es proporcionar a
la concentración de dichos anticuerpos.

15 2.- Un método según la reivindicación 1, caracte-
rizado porque dicho antígeno es ácido desoxirribonucleico
natural y los anticuerpos son anticuerpos frente al ácido
desoxirribonucleico natural en lupus erythematosus sistémico.

20 3.- Un método según la reivindicación 1, donde di-
cho antígeno es inmunoglobulina G de conejo, y dichos anti-
cuerpos son anticuerpos frente a la inmunoglobulina G en
artritis reumatoide.

25 4.- Un método según la reivindicación 1, donde di-
cho antígeno es tiroglobulina humana y dichos anticuerpos
son anticuerpos frente a la tiroglobulina en tiroiditis
autoinmune.

5.- Un método según la reivindicación 1, donde di-
cho antígeno es un extracto de núcleos del timo de ternera
y los anticuerpos son anticuerpos anti-núcleos.

30 6.- Un método según la reivindicación 1, donde el



1 conjugado insoluble obtenido de suero bovino metilado y el
antígeno retienen la especificidad antigénica de dicho anti-
2 geno.

5 7.- Un método según la reivindicación 1, donde
la albúmina de suero humano metilada, sustituye a la albú-
mina de suero bovino metilada.

8.- Un método según la reivindicación 1, donde un
extracto de núcleos celulares soluble sustituye a dicho ele-
mento.

10 9.- Un método según la reivindicación 8, donde
dicho extracto de núcleos celulares soluble es antígeno nu-
clear extraíble.

15 10.- Un método según la reivindicación 9, donde
dicho antígeno nuclear extraíble se utiliza en un ensayo
para la detección de anticuerpos para enfermedades de te-
jido conjuntivo mixto.

20 11.- Se reivindica por último como objeto sobre el
que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
" UN METODO PARA DETECTAR ANTICUERPOS ".

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

Madrid, 1 de Junio de 1979

BERNARDO UNGRIA

