



ESPAÑA

10 ES	11 NUMERO 484.166	10 A1
21	22 FECHA DE PRESENTACION 14-9-1.979	

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

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO P 28 40 847.1	32 FECHA 20-9-78	33 PAIS R.F.A.
---	---------------------	-------------------

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL G01N 33/16	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	--	--------------------------------------

64 TITULO DE LA INVENCION "PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCION Y DETERMINACION DE UN ANTICUERPO FIJADOR DE COMPLEMENTO"
--

71 SOLICITANTE (S) BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT (HOE 78/B 011)
--

DOMICILIO DEL SOLICITANTE D-3550 Marburg/Lahn, R.F.A.
--

72 INVENTOR (ES) Dr. Horst Zahner, Dr. Aruna Tandon y Prof. Dr. Georg Lämmler
--

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE DON OSCAR DE ELZABURU FERNANDEZ (P.- 72.538)
--

RP.

La invención se refiere a un procedimiento para la detección y determinación de anticuerpos fijadores de complemento, sobre todo en líquidos corporales, por medio de un reactivo marcado con enzima.

5 Anticuerpos fijadores de complemento son los anticuerpos que se forman por ejemplo en el caso de enfermedades infecciosas y poseen dos grupos haptóforos para la unión con el antígeno y con el complemento (amboceptores). La detección de anticuerpos fijadores de complemento con el ensayo de fijación de complemento es un procedimiento practica-
10 do frecuentemente en la serología. Especialmente se ha acreditado este método en la virología y parasitología como método a elegir para la detección indirecta y para la diferenciación etiológica de enfermedades infecciosas.

15 El ensayo de fijación de complemento es, como se sabe, difícil de manipular y requiere una serie de reactivos exactamente adaptados entre sí. La detección propiamente dicha de los anticuerpos fijadores de complemento se basa en la hemólisis de eritrocitos, dependiente del complemento. Por lo tanto es necesario normalizar primeramente el
20 sistema hemolítico, después de lo cual a partir de la hemólisis dependiente del complemento, que discurre secundariamente, puede obtenerse conclusión sobre la existencia de anticuerpos fijadores del complemento y su cantidad. El procedimiento es tanto costoso en cuanto a tiempo como también

tal que ha de practicarse por personal especialmente adiestrado. Por consiguiente, existe una necesidad de simplificar el procedimiento para la detección y para la determinación de anticuerpos fijadores de complemento.

5 Esta misión se resuelve conforme a la invención realizando la reacción con una fase insoluble en agua y empleando, en lugar del sistema hemolítico, un agente de marcación comprobable con elevada sensibilidad y cuantitativamente determinable.

10 Objeto de la invención es por consiguiente un procedimiento para la detección y determinación de un anticuerpo fijador de complemento, por reacción de éste con un participante en la fijación y complemento, caracterizado porque insolubiliza un participante en la fijación del anticuerpo fijador de complemento, se lleva a reacción el participante en la fijación, insolubilizado, con el anticuerpo fijador de complemento así como con el sero-complemento, se hace reaccionar el producto de reacción con un producto de copulación de un participante en la reacción del sero-complemento con un agente de marcación cuantitativamente determinable, y finalmente se determina el agente de marcación.

25
18099

El participante en la fijación para el anticuerpo fijador de complemento es habitualmente el antígeno correspondiente al anticuerpo. Lo son por ejemplo los anti-

5 genos virales, contra los que el organismo infectado forma como reacción defensiva los interesantes anticuerpos fijadores de complemento. Hay que mencionar aquí, por ejemplo, citomegalias, antígenos de herpes simplex y de sarampión, antígenos de influenza y parainfluenza, antígenos de rubeola, de sincisio respiratorio (Respiratory syncytial), de paperas, de ornitosis, de fiebre Q, de coriomeningitis y de Mycoplasma pneumoniae, además antígenos de brucelosis (Brucella), toxoplasma y de enfermedad de Chagas, para sólo en 10 tresacar algunos de entre el gran número de los antígenos que pueden enumerarse.

Participante en la reacción de este participante en la fijación, insolubilizado, es el anticuerpo fijador de complemento así como el complemento propiamente dicho.

15 El complemento es un componente relativamente inestable de la sangre, que según los conocimientos actuales consta de más de 10 factores diferentes. Es sabido que el complemento pierde su actividad al calentarse a 56° C así como también al reposar durante largo tiempo a temperatura 20 ambiente. El suero animal recientemente recogido es utilizable por lo general como fuente de complemento. En el sentido de la invención entra en consideración el suero humano así como el suero animal, sobre todo el de cobaya.

El componente que reacciona específicamente con el complemento es convenientemente un anticuerpo dirigido

5 contra uno de los factores del complemento. A partir de la
opinión experimentalmente deducida de los modos de reacción
de anticuerpos fijadores de complemento y del complemento se
prefieren los anticuerpos contra dichos componentes del com-
plemento que reaccionan en primer término con el anticuerpo
fijador de complemento. Según ello entran en consideración
como componente de reacción anticuerpos contra los facto-
res del complemento C 3 así como C 5 hasta C 9. Se prefie-
ren especialmente anticuerpos contra el factor del comple-
10 mento C 3. Para ello se emplea una adecuada fracción de in-
munoglobulina de un suero que contiene los correspondientes
anticuerpos.

15 Como agentes de marcación de los componentes de
reacción mencionados anteriormente, por lo general de los
anticuerpos contra los factores del complemento C₁ hasta C₉,
entran en consideración las sustancias cuya detección en pe-
queña concentración es posible con suficiente exactitud. Pa-
ra ello son conocidas sobre todo enzimas como sustancias
marcadoras. En algunos casos puede ser ventajoso emplear,
20 en lugar de ello, un isótopo radioactivo, un grupo fluores-
cente u otro agente de marcación. El correspondiente agente
de marcación ("marcador"), por lo general la enzima, está
unido con el participante en la reacción del complemento de
manera que no se efectúa ninguna separación en las condicio-
nes de la reacción. El agente de marcación, por ejemplo la

enzima, puede detectarse o determinarse cuantitativamente de manera conocida. Del resultado puede obtenerse conclusión sobre la presencia o la cantidad del anticuerpo fijador de complemento.

5 En el sentido de la invención, el participante en la fijación para el anticuerpo fijador del complemento se utiliza de forma no disuelta en el procedimiento de determinación. Esto puede efectuarse por adsorción física o por fijación química covalente sobre la superficie de un soporte insoluble. Es ventajosa la fijación a la pared interna del reactor, en el que ha de realizarse el procedimiento de determinación. Son especialmente preferidos recipientes de material sintético a base de poli(cloruro de vinilo) o de poliestireno así como soportes (llamados varillas o basto-

10 nes) a base de los mismos materiales, que para la reacción se sumergen en las soluciones de reacción, debido a su propiedad de fijación por adsorción para la mayor parte de los antígenos. Sin embargo, se pueden emplear también otros materiales, que o bien poseen una afinidad para los participantes en la fijación de los anticuerpos o bien hacen posible su fijación covalente. Son también especialmente adecuadas placas de microvaloración, tal como son conocidas por ejemplo a partir de la DE-OS 26 33 283.

15 Dentro del marco del procedimiento conforme a la invención se añade a este participante en la fijación, in-

solubilizado, para anticuerpos fijadores de complemento, la solución que se comprueba en cuanto a la presencia de anticuerpos fijadores de complemento, o se introduce el soporte en la solución, en la que han de determinarse cuantitativamente los anticuerpos fijadores de complemento. Además se añade complemento a la mezcla de reacción. Se consigue una dilución adecuada del complemento, si esto es necesario en un caso individual, por medio de soluciones también usuales en la analítica bioquímica. Es especialmente adecuado por ejemplo el tampón de barbiturato, propuesto para ello por E.A. Kabat y M.M. Mayer, *Experimental Immunochimistry*, 2ª edición, 1964, página 149, que contiene $MgCl_2$ y $CaCl_2$. Después de un tiempo de reacción de 1 hasta 2 horas, preferentemente 2 horas y una temperatura de $4^{\circ}C$ hasta $37^{\circ}C$, preferentemente a aproximadamente $20^{\circ}C$, la fase sólida de la mezcla de reacción es separada de la fase líquida y la fase sólida se lava varias veces. Parece suficiente y ventajoso un lavado de 2 hasta 5 veces con una solución diluida de sal, preferentemente una solución de sal con un contenido menor de 1%. Es especialmente adecuada una solución de sal común aproximadamente al 0,9%. Esta solución de sal puede contener eventualmente una concentración pequeña de un detergente, que no irrite la fase sólida de los reactivos específicos, resultante por la reacción. Aquí es especialmente adecuado monolaurato de polioxi

etilensorbitan (Tween 20) en una concentración $< 1\%$.

En una etapa siguiente del procedimiento se hace reaccionar luego la fase sólida con el participante en la reacción marcado del complemento. Para ello se considera como conveniente un tiempo de reacción comparable como en la primera etapa, pero no se requiere elegir iguales tiempos de reacción. Puede ser útil prever algo más largo el tiempo de reacción de la segunda etapa. La eliminación del material no reaccionado se efectúa de nuevo por lavado, tal como después de la primera etapa de reacción.

Dado que el agente de marcación fijado, dependiendo de la cantidad del anticuerpo fijador del complemento, que está presente, está fijado a la fase sólida, se puede obtener conclusión, a partir de la cantidad fijada así como de la cantidad liberada del agente de marcación, sobre la cantidad del anticuerpo fijador del complemento. Sólo es necesaria la determinación del agente de marcación fijado o libre según procedimientos conocidos en sí; en el caso de las enzimas, empleadas preferentemente como agentes de marcación, la actividad enzimática. Son preferidas las enzimas cuya determinación puede realizarse de manera sencilla.

En primer lugar lo son las enzimas que permiten una determinación espectrofotométrica o colorimétrica. Por consiguiente, una ventaja especial del procedimiento conforme a la invención consiste en que es posible una automati-

zación de la determinación. Por consiguiente es automatizable también la determinación de anticuerpos fijadores de complemento.

5 Las enzimas, que se prefieren especialmente como agentes de marcación son oxidasas e hidrolasas, sobre todo fosfatasa alcalina, glucosaoxidasa y peroxidasa, para sólo mencionar algunas a modo de ejemplos.

10 Los reactivos necesarios para el procedimiento son, por consiguiente, el participante en la fijación, fijado al soporte, del anticuerpo fijador de complemento, por ejemplo el antígeno; el complemento; el anticuerpo contra un factor del complemento que está unido con un agente de marcación, sobre todo una enzima; así como reactivos eventualmente necesarios para la detección del agente de marca
15 ción, por ejemplo el sustrato de enzima.

Objeto de la invención son, por consiguiente, también los reactivos requeridos para la detección y para la determinación de anticuerpos fijadores de complemento, así como su utilización en el sentido de la invención.

20 La invención se explica más detalladamente con ayuda del ejemplo siguiente.

Ejemplo:

En recipientes de material sintético de 0,3 ml de capacidad, vendidos por Dynatech Deutschland GmbH, de

Flochingen, se envasan en cada caso 0,2 ml de una solución de antígeno de enfermedad de Chagas que contiene 100 µg de antígeno/ml disuelto en tampón de Na_2CO_3 0,05 M de pH 9,6 y se deja reposar durante la noche.

5 Después de ello se vacían los recipientes y se lavan tres veces con solución fisiológica de sal común con adición de 0,07% de Tween 20. Estos recipientes constituyen después de ello el antígeno fijado al soporte, que puede utilizarse para el procedimiento para la determinación de anticuerpos fijadores de complemento.

10

 Para el procedimiento de determinación se envasan en los recipientes en cada caso 0,1 ml del suero a comprobar en una dilución adecuada y 0,1 ml de un suero humano normal diluido en 1:20, que es eficaz como complemento. La dilución se prepara con un tampón de veronal, que contiene MgCl_2 y CaCl_2 (Kabat y Mayer 1964 en el lugar citado). Se deja reposar la mezcla durante 2 horas a temperatura ambiente y a continuación se lava tres veces con la solución de lavado mencionada anteriormente. Después de ello se añaden a los recipientes vaciados 0,1 ml de una globulina anti-C3 humana, que se conjugó con fosfatasa alcalina según el método de E. Engvall y P. Perlmann, Z. Immunol 109, (1972), páginas 129-135. En un ensayo previo se determinó que la dilución adecuada de este reactivo es de 1:200 con solución de sal común tamponada con fosfato y una adición de

15

20

25
18099

0,05% de Tween 20. Se deja reposar esta mezcla durante 3 horas a temperatura ambiente, se lava 2 veces con la solución de lavado mencionada anteriormente y se vierten en cada recipiente 0,2 ml de la solución de sustrato para la fosfatasa alcalina. Esta contiene 1 mg de fosfato de paranitrofenilo/ml en 0,05 ml de tampón de Na_2CO_3 de pH 9,8 y 10^{-3} M de MgCl_2 . Después de 20 minutos a temperatura ambiente se añaden 0,1 ml de una NaOH 0,1 M. De esta manera se detiene la reacción. La determinación cuantitativa del fosfato de paranitrofenilo desdoblado se efectúa por fotometría a una longitud de onda de 405 nm. Pueden tratarse al mismo tiempo cargas comparativas con sueros normales así como sueros de referencia positivos.

15

20

25
18099

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 detección y para la determinación de un anticuerpo fijador de complemento por su reacción con un participante en la fijación y complemento, caracterizado porque se insolubiliza un participante en la fijación del anticuerpo fijador de complemento, se lleva a reacción el participante en la fijación insolubilizado con el anticuerpo fijador de complemento así como con el serocomplemento, se hace reaccionar el producto de reacción con un producto de copulación de un participante en la reacción del serocomplemento y con un agente de marcación cuantitativamente determinable, y se determina finalmente el agente de marcación.

15

20

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el participante en la fijación del anticuerpo fijador de complemento es insolubilizado en el interior de un tubito de reacción o junto a la superficie de

un soporte.

3ª.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1ª ó 2ª, caracterizado porque como participante en la reacción del serocomplemento se emplea un anticuerpo contra un factor del complemento.

5

4ª.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1ª hasta 3ª, caracterizado porque el agente de marcación es una enzima.

5ª.- Procedimiento para la detección y determinación de un anticuerpo fijador de complemento.

10

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

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

15

Madrid, 02.OCT.1979

P.A.

Oscar de Eizaburu
Por Poder
[Handwritten Signature]

20

25

24099
(MLF)
EBL.