

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①① Número de publicación: **2 141 684**

②① Número de solicitud: 009801510

⑤① Int. Cl.⁷: G01N 33/543

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

②② Fecha de presentación: **15.07.1998**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2000**

Fecha de concesión: **06.10.2000**

④⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.12.2000**

④⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.12.2000

⑦③ Titular/es: **UNIVERSIDAD DE GRANADA
Acera de San Ildefonso, 42-44
18071 Granada, ES**

⑦② Inventor/es: **Molina Bolívar, José Antonio;
Galisteo González, Francisco e
Hidalgo Alvarez, Roque**

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Tampón de reacción para estabilizar partículas látex-IgG para test de inmunoaglutinación.**

⑤⑦ Resumen:

El objetivo de esta patente titulada "Tampón de reacción para estabilizar partículas látex-IgG para test de inmunoaglutinación" es la descripción de un tampón que permite estabilizar coloidalmente partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos o antígenos para su uso en test de inmunodiagnóstico. Las estrategias que actualmente se utilizan para conseguir tal estabilización son caras o no se pueden utilizar para algunos sistemas. En esta patente se reivindica el uso de un tampón de reacción formado ácido bórico (H_3BO_3) 0.015 M a pH 8 con una concentración de $Mg(NO_3)_2$ (u otra sal de cationes divalentes) superior o igual a 0.3 M mas 0.170 M de NaCl para estabilizar sistemas látex-anticuerpo o látex-antígeno para su uso como kit de inmunoensayo.

ES 2 141 684 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Tampón de reacción para estabilizar partículas látex-IgG para test de inmunoaglutinación
Objeto de la invención.

Obtención de un tampón de reacción para asegurar la estabilidad coloidal de kits de inmunodiagnóstico formados por partículas de látex recubiertas con IgG. De una forma rápida, fácil y muy económica se consigue estabilizar complejos látex-IgG capaces de aglutinar en presencia de PCR. Esta estabilización es extensible al resto de sistemas látex-anticuerpo o látex antígeno que presenten inestabilidad coloidal en condiciones fisiológicas.

Este método facilita la estabilización del complejo en contraste con las actuales que son más tediosas y costosas.

Antecedentes.

La aglutinación de partículas de látex sensibilizadas constituye uno de los métodos de inmunodiagnóstico más simples y rápidos. En un inmunoensayo, de este tipo, las partículas de látex en cuya superficie se ha adsorbido un anticuerpo (o antígeno) se mezclan con la muestra a analizar y que contiene el antígeno específico correspondiente (o anticuerpo). La existencia de reacciones antígeno-anticuerpo cruzadas entre partículas de látex conduce a la aglutinación del coloide que se puede cuantificar mediante turbidimetría, nefelometría, anisotropía angular, etc.

Los primeros inmunoensayos fueron realizados por Singer y Plotz¹ al detectar el factor reumatoide en el suero humano mediante partículas poliméricas recubiertas de inmunogammaglobulina G (IgG).

En la actualidad esta técnica es ampliamente utilizada en química clínica habiéndose aplicado para la detección de más de 80 enfermedades infecciosas, incluyendo el SIDA. De igual forma, existen reactivos comerciales repartidos en disciplinas como son alergias, test de embarazo, detección de cáncer, marcadores tumorales o hepáticos, pruebas tiroideas, identificación y cuantificación de numerosas sustancias como las hormonas, etc.²

Uno de los principales factores que determinan la utilidad de un sistema látex-anticuerpo (o látex-antígeno) como kit de inmunoaglutinación es su estabilidad coloidal en ausencia del agente aglutinante (antígeno o anticuerpo).

Generalmente, estos sistemas de diagnosis están enfocados hacia la detección y cuantificación de antígenos o anticuerpos presentes en muestras de sangre, saliva o suero. Así pues, el medio en el que se llevará a cabo el ensayo tendrá un pH en tomo a 8 y una fuerza iónica de 170 mM (condiciones fisiológicas).

En estas condiciones el complejo látex-proteína debe de ser coloidalmente estable. En caso contrario, la aglutinación del látex sensibilizado conducirá a un diagnóstico erróneo³.

Un ejemplo típico de látex sensibilizado inestable en condiciones fisiológicas lo constituyen aquellos sistemas poliméricos recubiertos superficialmente por IgG⁴⁻⁶. Este anticuerpo, en la mayoría de los animales, presenta una banda de puntos isoelectrónicos comprendida entre 6.5 y 8.5. De tal forma que las partículas de látex sensibiliza-

das con IgG coagulan fácilmente a pHs próximos al fisiológico. Ello se debe a que la capa proteica tiene una carga neta nula en estas condiciones y en consecuencia no existen repulsiones electrostáticas entre las partículas y éstas coagulan. La desestabilización se incrementa aún más al ser la fuerza iónica del medio de 170 mM.

Existen una serie de estrategias que permiten estabilizar sistemas coloidales polímero-IgG:

- Utilización de moléculas de IgG monoclonales en lugar de policlonales^{7,8}. La IgG monoclonal puede tener diferente punto isoelectrónico que la IgG policlonal. Los complejos látex-IgG monoclonal presentan una cierta estabilización electrostática a pH fisiológico. El inconveniente de esta estrategia es que las moléculas de IgG monoclonales son más caras y están menos disponibles que las de IgG policlonales.
- Empleo del fragmento F(ab')₂ en lugar de la IgG⁹⁻¹¹. El fragmento F(ab')₂ es la parte de la IgG responsable del reconocimiento antigénico. Su punto isoelectrónico es más ácido que el de la IgG policlonal consiguiéndose estabilizar los complejos látex-F(ab')₂ por repulsiones electrostáticas. Ahora bien, los fragmento F(ab')₂ están menos disponibles y su obtención es complicada y costosa. Por otra parte, al adsorberse la F(ab')₂ sobre la superficie del polímero se produce una cierta pérdida de reactividad.
- Empleo de soportes poliméricos hidrofílicos en lugar de poliestireno^{12,13}. El problema de la utilización de estos sistemas es que el anticuerpo o el antígeno, debe de unirse a través de enlaces covalentes a la superficie. La adsorción física espontánea de proteínas sobre partículas hidrofílicas no está favorecida energéticamente.
- Utilización de proteínas inactivas. La utilización de proteínas como la albúmina, cuyo punto isoelectrónico es 4.7, permiten estabilizar electrostáticamente complejos látex-IgG¹⁴⁻¹⁸. Estas proteínas se adsorben sobre el látex una vez sensibilizado. Uno de los inconvenientes que presenta esta estrategia es que la IgG puede ser desorbida por la BSA si el kit es conservado durante períodos largos de tiempo; sólo se puede utilizar cuando el recubrimiento de IgG no es total de tal forma que queden huecos y no siempre consigue estabilizar al complejo.
- Utilización de surfactantes no iónicos¹⁹. Estos surfactantes permiten estabilizar estéricamente a los complejos. Como inconvenientes podemos encontrar la desnaturalización de la IgG la desorción de la IgG, así como la disminución de reactividad.

En definitiva, las estrategias que actualmente se utilizan con el fin de estabilizar sistemas látex-IgG para su uso como inmunoreactivos implican un tratamiento del látex sensibilizado mediante el

uso de agentes estabilizantes (BSA ó surfactantes) o bien el empleo de anticuerpos (IgG monoclonal ó F(ab')₂) más caros y difíciles de obtener que la IgG policlonal.

Otros problemas que plantean los sistemas látex-IgG en cuanto a su uso como kit de inmunodiagnóstico, son las reacciones inespecíficas. Las zonas de la superficie de la partícula que no están recubiertas por IgG pueden conducir a reacciones inespecíficas. También, el fragmento Fc de la molécula de IgG puede unirse a los factores reumatoideos produciendo falsos positivos en el diagnóstico de la patología buscada.

Referencias.

- 1.- J.M. Singer y C.M. Plotz. (1956). *Amer. J. Med.*, 21, 888.
- 2.- L. Borque. (1992). *Boletín Bibliográfico Behring*. 6, 13.
- 3.- M. Okubo, Y. Yamamoto, M. Uno, S. Kamei T. Matsumoto. (1987). *Colloid & Polym. Sci.* 265, 1061.
- 4.- A. Martín, J. Puig, F. Galisteo, J. Serra, R. Hidalgo-Alvarez. (1992). *J. Dispersion Sci. Technol.* 13, 399.
- 5.- A. Fernández-Barbero. (1991). Memoria de Licenciatura. Universidad de Granada.
- 6.- M. Nakamura, H. Ohshima y T. Kondo. (1992). *J. Colloid Interface Sci.* 149,241.
- 7.- F. Galisteo González. (1992). "Adsorción de proteínas sobre modelos coloidales". Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- 8.- C. Davey, D.J. Newman, C.P. Price, J.L. Ortega, F.J. de las Nieves y R. Hidalgo. (1993-94). *Acción Integrada Hispano-Británica* 247 B.
- 9.- F.V. Bright, T.A. Betts y K. Litwiler. (1990). *Anal. Chem.* 62, 1065.
- 10.- J.L. Ortega, M.J. Gálvez y R. Hidalgo-Alvarez. (1995). *Prog. Colloid Polym Sci.* 98,233.
- 11.- J.L. Ortega, M.J. Gálvez y R. Hidalgo-Alvarez. (1996). *Langmuir*. 12, 3211.
- 12.- P. Montagne, P. Varcin, M.L. Cuillère y J. Duheille. (1992). *Bioconjugate Chem.* 3, 187.
- 13.- H. Kitano, S. Iwai, T. Okubo y N. Ise. (1987). *J. Am. Chem. Soc.* 109, 7608.
- 14.- A.V. Elgersma, R.L.J. Zsom, W. Norde y J. Lyklema. (1991). *Colloids Surfaces*, 54,89.
- 15.- M.D. Bale, S.J. Danielson, J.L. Daiss, K.E. Goppert, R.C. Sutton. (1989). *J. Colloid Interface Sci.* 132, 176.
- 16.- A. Kondo, S. Oku, K. Higashitani. (1991). *Biotechnol. Bioeng.* 37, 537.

17.- T. Arai and W. Norde. (1990). *Colloids Surfaces*, 51, 17.

18.- E. Lutanie, J.C. Voegel, P. Schaaf, M. Freund, J.P. Cazenave, A. Schmitt. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 89, 9890.

19.- S. Matsuzawa. (1982). *Nippon Houigaku-shi*, 36, 826.

Explicación de la invención.

La invención consiste en la estabilización de partículas del complejo mediante un tampón de ácido bórico, (H₃BO₃) 0.015 M a pH 8 que tenga una concentración de Mg(NO₃)₂ (u otra sal de cationes divalentes) superior a 0.3 M más 0.170 M de NaCl. Como ejemplo concreto se puede utilizar como tampón de reacción para la inmunaglutinación de un sistema Latex-IgG el siguiente:

– buffer de ácido bórico (H₃BO₃) 0.015 M a pH 8.

– 170 mM NaCl

– 300 mM Mg(NO₃)₂

Mediante el uso de nitrato de magnesio en la concentración especificada se consigue estabilizar el coloide sin necesidad de adsorber sustancias estabilizadoras sobre el sistema látex-IgG. La estrategia de estabilización descrita es mucho más fácil, rápida y económica que las que actualmente existen en el mercado.

Por otra parte, al realizarse los inmunoensayos a elevada fuerza iónica la posibilidad de que se produzcan reacciones inespecíficas disminuye.

Descripción de la invención.

Con el fin de demostrar la utilidad de uso de este tampón de reacción se van a presentar los resultados de inmunoreactividad obtenidos para un sistema látex-IgG inmunológicamente activo frente a la proteína reactiva, C (PCR) utilizando como tampón de reacción el anteriormente descrito.

Como anticuerpo se ha utilizado IgG policlonal capaz de reconocer PCR. Este anticuerpo fue adsorbido sobre un látex obteniéndose tres complejos con diferente recubrimiento: 1.37 mg/m², 3.28 mg/m² y 4.24 mg/m².

La nefelometría ha sido la técnica usada para seguir y cuantificar la inmunaglutinación. La intensidad dispersada para un ángulo de 10° fue registrada durante 10 minutos una vez mezclado el látex sensibilizado y el PCR, ambos disueltos en el tampón de reacción: 170 mM NaCl, 300 mM Mg (NO₃)₂ y H₃BO₃ a pH 8.

En las gráficas 1, 2 y 3 se muestran la estabilidad coloidal en ausencia de PCR de los tres complejos en función de la fuerza iónica del tampón de reacción. La figura 1 corresponde al complejo con un recubrimiento de 1.37 mg/m², la figura 2 es la del complejo de 3.28 mg/m² y la figura 3 corresponde al complejo de 4.24 mg/m². Los cuadrados cerrados corresponden al tampón de reacción de 170 mM NaCl y los cuadrados abiertos al tampón de reacción de 170 mM NaCl más 300 mM Mg(NO₃)₂ (tal y como se indican en las figuras).

Como se puede ver, en condiciones fisiológicas (170 mM los complejos son inestables (aumento de la intensidad dispersada con el tiempo). Estos complejos por lo tanto no serían útiles como kit de inmunoensayo. Ahora bien, cuando en el tampón de reacción la fuerza iónica se incrementa añadiendo $Mg(NO_3)_2$ en una concentración de 300 mM, los sistemas látex-IgG son estables. A los 40 días de incubar los complejos en el tampón de reacción se comprobó que éstos seguían siendo

estables. Así pues el procedimiento inventado para estabilizar complejos látex-IgG es útil para todos los recubrimientos proteicos.

La figura 4 muestra los resultados de inmunoreactividad obtenidos para los tres recubrimientos y utilizando como medio de reacción el tampón objeto de la invención.

Como se puede comprobar los tres kits utilizados son muy reactivos pudiéndose utilizar por lo tanto como test comerciales.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Tampón de reacción para realizar tests de inmunoaglutinación de látex **caracterizado** por la estabilización de partículas de látex recubiertas

con antígeno o anticuerpo mediante un tampón con la siguiente composición: ácido bórico (H_3BO_3) 0.015 M a pH 8, una concentración de $Mg(NH_4)_2$ (u otra sal de cationes divalentes) igual o superior a 0.3 M mas 0.170 M de NaCl.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

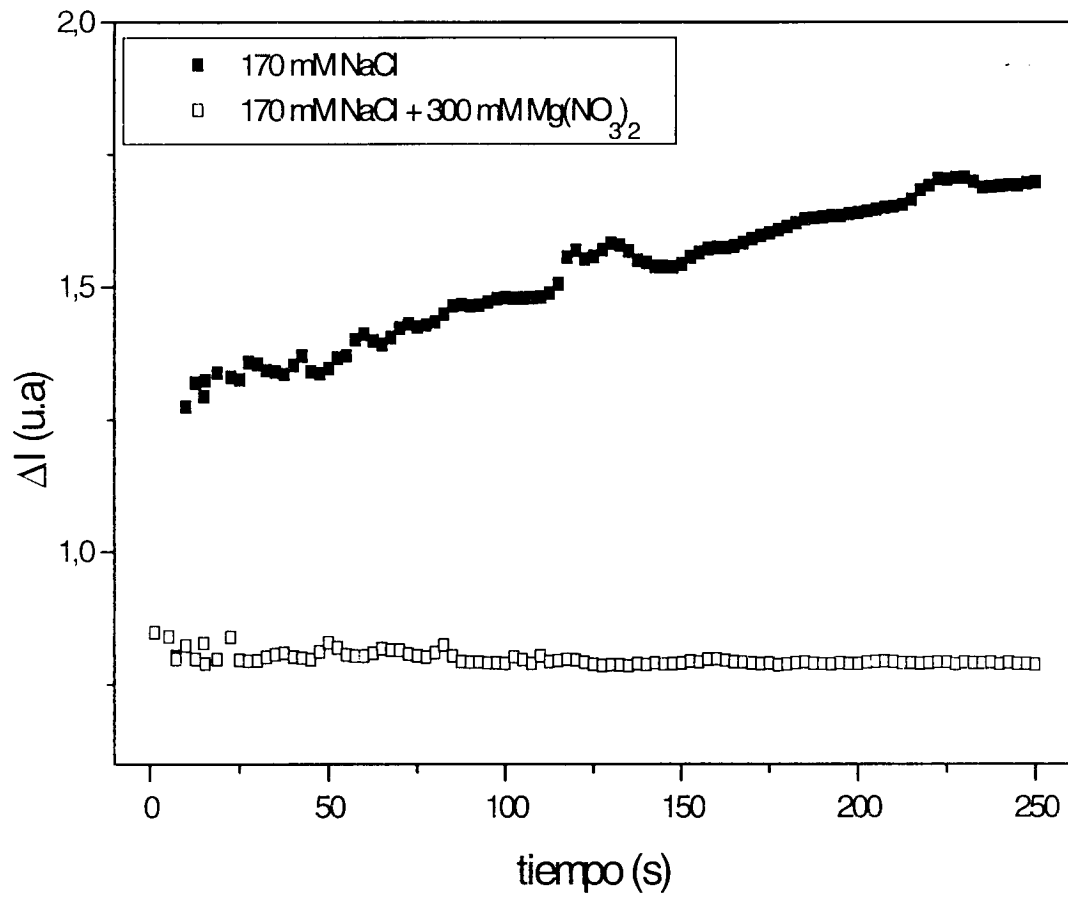


Figura 1

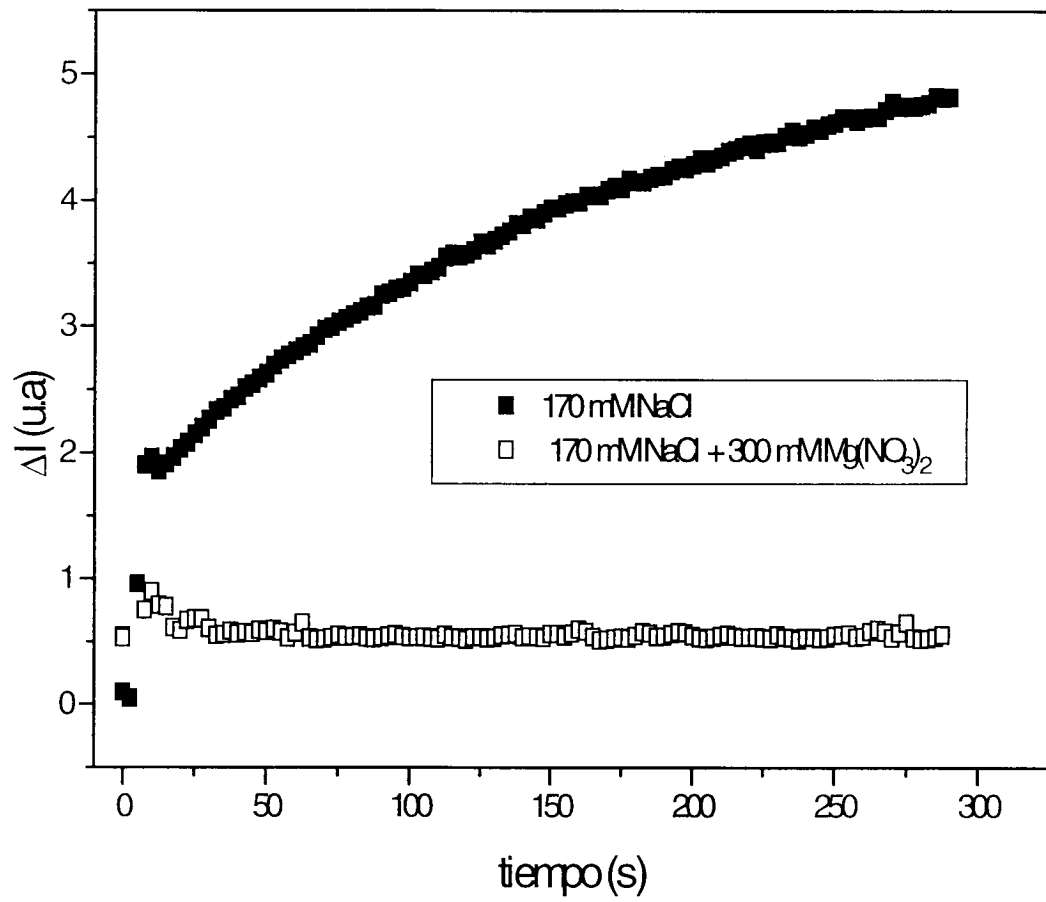


Figura 2

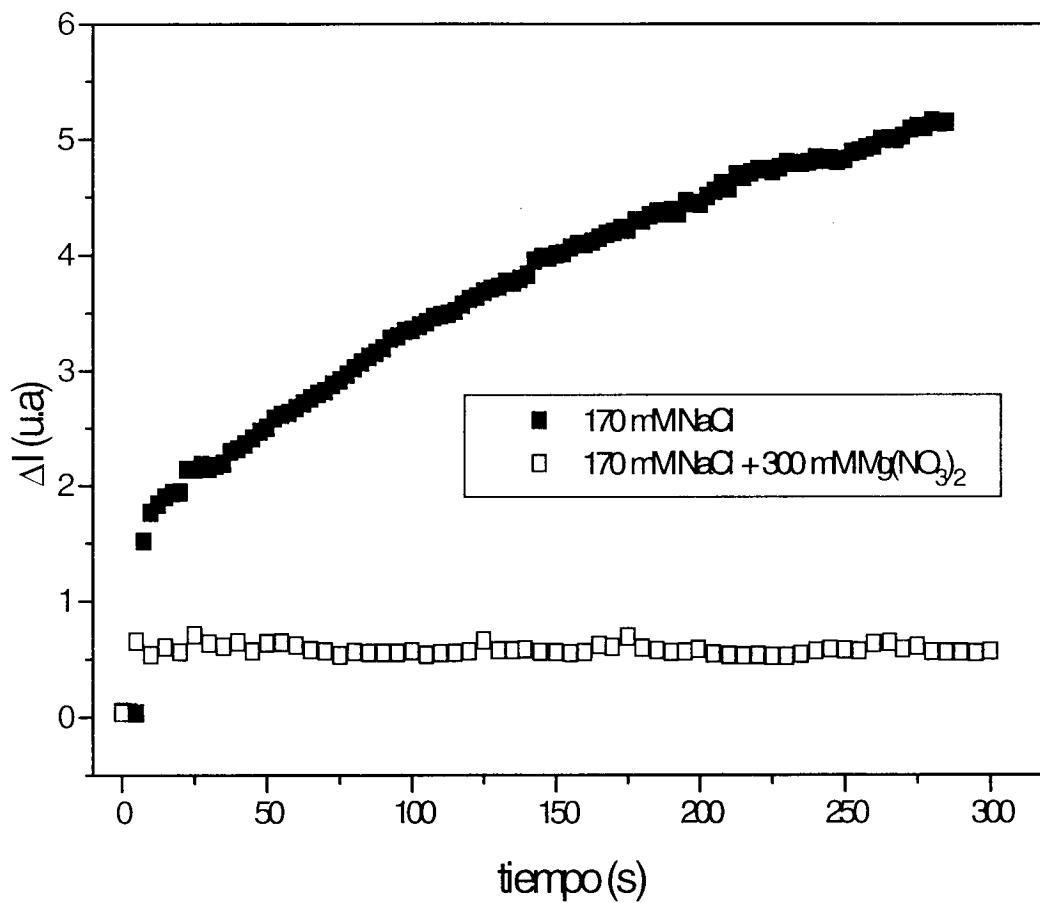


Figura 3

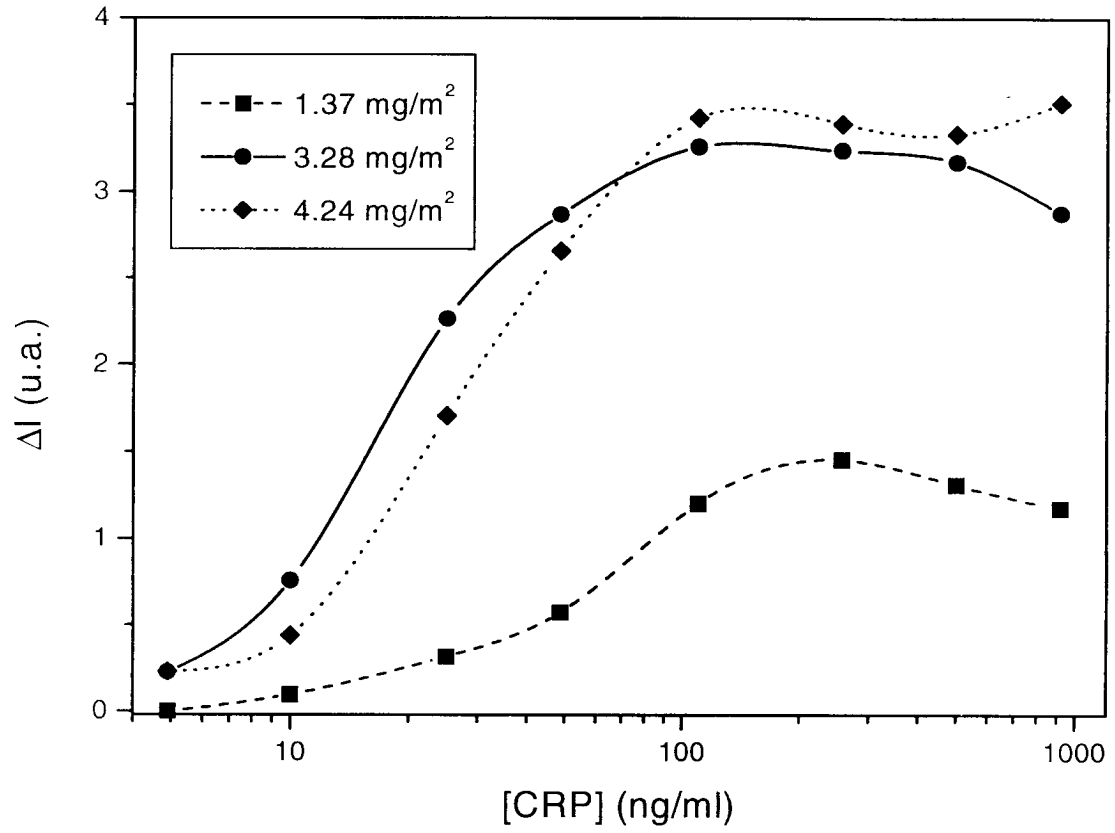


Figura 4



① ES 2 141 684

② N.º solicitud: 009801510

③ Fecha de presentación de la solicitud: 15.07.1998

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: G01N 33/543

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MOLINA-BOLIVAR J.A. et al.: "Particle enhanced immunoassays stabilized by hydration forces: a comparative study between IgG and F(ab') ₂ immunoreactivity". 01 Feb 1998. JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, Vol. 211 (1-2). Páginas 87-95.	1
Y	BASE DE DATOS WPI, Londres: Derwent Publications Ltd., n.º acceso 1983-842786, SU 240181 A (MED. PARASIT TROP) 30.07.1969, resumen.	1
Y	JP 56-002555 A (GREEN CROSS CORP.) 12.01.1981, resumen.	1
A	EP 0106122 A3 (MILES LABORATORIES, INC.) 25.04.1984, página 5, líneas 5-17.	1

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

08.02.2000

Examinador

A. Collados Martín Posadillo

Página

1/1