



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 123**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/543** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05023392 .3**  
96 Fecha de presentación : **26.10.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1653233**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.05.2006**

54 Título: **Método para la determinación de anticuerpos de una clase específica utilizando un anticuerpo inmunocomplejo específico.**

30 Prioridad: **30.10.2004 DE 10 2004 052 729**

73 Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**  
**Grenzacherstrasse 124**  
**4070 Basel, CH**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**17.10.2011**

72 Inventor/es: **Klause, Ursula;**  
**Lenz, Helmut y**  
**Markert-Hahn, Christine**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**17.10.2011**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 366 123 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método para la determinación de anticuerpos de una clase específica utilizando un anticuerpo inmunocomplejo específico

5 La presente invención se refiere a un método para la determinación de anticuerpos específicos de antígeno de una clase específica de inmunoglobulina en una muestra, por medio de un inmunoensayo en ("microspot array format"), en el que varios miembros de unión  $B_{nx}$  se unen de manera específica en diferentes áreas discretas sobre un soporte, en el que  $B_{nx}$  contiene en cada caso los diferentes antígenos que son capaces de unirse específicamente a los anticuerpos a detectar por incubación del soporte con la muestra, retirando el exceso de inmunoglobulina e incubando con un miembro de unión  $B_2$ , que es un anticuerpo o un fragmento del mismo y que lleva una etiqueta y, detectando posteriormente la etiqueta en las respectivas áreas discretas, caracterizado porque el miembro de unión es utilizado como  $B_2$  que se une específicamente a anticuerpos de una cierta clase de inmunoglobulina que han sido unidos de manera específica de antígeno, mientras que las inmunoglobulinas unidas de manera no específica a la fase sólida no son detectadas o lo son, solamente, en una medida que se puede despreciar.

En particular, la invención se refiere a un método para reducir el valor de nulo ("blank") debido a anticuerpos específicos no antígenos, unidos de manera no específica en inmunoensayos en un formato de disposición microespacio para detectar anticuerpos específicos de antígeno.

20 El sistema inmune del organismo de un mamífero produce anticuerpos que son llamados también inmunoglobulinas, como respuesta a la introducción de sustancias extrañas. Se utilizan para defenderse contra las sustancias extrañas a la que se hace referencia también como antígenos. Las inmunoglobulinas pueden ser divididas en cinco clases distintas. Se distinguen inmunoglobulinas de las clases M, G, A, E y D. Estas cinco clases de inmunoglobulinas difieren entre sí con respecto a la composición de la cadena pesada, a la que se hace referencia como cadena  $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ , o  $\delta$ .

Cada clase de inmunoglobulina tiene una función distinta en el organismo. Las inmunoglobulinas de clase M aparecen cuando se hace un primer contacto con el antígeno, la llamada inmunización primaria. No obstante, la concentración de estas inmunoglobulinas disminuye rápidamente al avanzar la infección. Las inmunoglobulinas de clase G son formadas al principio lentamente durante una inmunización primaria, y aparecen en grandes cantidades cuando existe una segunda infección con el mismo antígeno. Las inmunoglobulinas de clase A se encuentran en las superficies mucosas del organismo y son responsables de los procesos de defensa que tienen lugar en el mismo. Las inmunoglobulinas de clase E son principalmente responsables de las reacciones alérgicas. La función exacta de las inmunoglobulinas de clase D es desconocida hasta el momento.

Las clases de inmunoglobulinas individuales aparecen en la sangre en concentraciones muy diferentes. De este modo, las inmunoglobulinas de clase G (IgG) son la clase que aparece en mayor proporción en el suero humano, encontrándose presentes en una proporción aproximada de 75%, que corresponde a un contenido en suero de 8 a 18 mg/ml. La segunda inmunoglobulina más frecuente es IgA, cuyo promedio de concentración en suero es de 0,9 a 4,5 mg/ml. Las inmunoglobulinas de clase M se encuentran presentes con una concentración de 0,6 a 2,8 mg/ml y las inmunoglobulinas de clase D se encuentran presentes con una concentración de 0,003 a 0,4 mg/ml. Los anticuerpos IgE se encuentran presentes en la proporción más baja y se presentan solamente con una concentración de 0,02 a 0,05  $\mu$ g/ml en el suero.

45 Para diagnósticos diferenciales de muchas enfermedades, es importante detectar anticuerpos de una o varias clases particulares de inmunoglobulina que son específicos para un cierto antígeno. Un diagnóstico satisfactorio, en el caso de infección vírica, bacteriana y parasítica, se puede asegurar solamente por medio de la detección de un anticuerpo de clase específica o excluyendo la presencia de ciertas clases de inmunoglobulina (por ejemplo, detección de anticuerpos IgG y IgA pero sin detección de anticuerpos IgM). Esto es, particularmente, importante para diferenciar entre infecciones recientes o agudas y las infecciones más antiguas, así como para monitorizar clínicamente el curso de una infección. La detección de anticuerpos de clase específica es especialmente importante para HIV, hepatitis A, hepatitis B, toxoplasmosis, rubella y clamidias en sus correspondientes infecciones. La detección específica de clase de anticuerpos que son específicos para un cierto antígeno es necesario también cuando se determina la titulación de anticuerpos de protección y para comprobar si una inmunización ha sido satisfactoria. Se describen varios métodos en la técnica anterior para detectar anticuerpos de una clase particular que son específicos para un antígeno. De este modo, anticuerpos específicos de antígeno de una clase particular, son detectados frecuentemente al unir el anticuerpo específico a una fase sólida recubierta con el antígeno específico. Las inmunoglobulinas (Ig) que son específicas para el antígeno y que están unidas a la fase sólida son detectadas por la unión con anticuerpos que están dirigidos específicamente contra Ig humana de una cierta clase a las moléculas (Ig) a detectar. Los anticuerpos, que están dirigidos contra Ig humana, están dotados de una etiqueta que es utilizada para la detección. No obstante, este procedimiento de pruebas es posible solamente cuando la totalidad de la Ig no unida, no específica, es retirada por lavado antes de la reacción con los anticuerpos etiquetados de manera específica de clase contra Ig humana. De este modo, por ejemplo, cuando se detectan moléculas Ig específicas en una muestra, cantidades relativamente grandes (4-20 mg/ml) de IgG no específicas se encuentran presentes que

pueden absorber de manera específica para la muestra en diferentes proporciones y unirse de manera no específica a la fase sólida. Si se utiliza un anticuerpo de detección contra las IgG, estas inmunoglobulinas unidas de manera no específica también se reconocerán y se unirán. Esto tiene como resultado elevadas señales de fondo y una sensibilidad reducida.

5 Un método para reducir estas señales de fondo consiste en modificar la fase sólida a efectos de evitar unión no específica de las inmunoglobulinas y utilizar aditivos tampón especiales que están destinados también a impedir la unión de inmunoglobulinas a la fase sólida (ejemplos: HydroGel™ de fase sólida (Perkin Elmer), Fast™ Slides (Schleicher & Schüll), detergentes, sales caotrópicas). Las modificaciones de la fase sólida son laboriosas y caras. 10 Además, ha resultado que los aditivos tampón pueden reducir la reactividad de algunos anticuerpos y, por lo tanto, puede reducir las señales. Las señales de fondo inducidas por inmunoglobulinas unidas de manera no específica incrementan el valor en blanco, lo que hace más difícil detectar anticuerpos específicos de una cierta clase de inmunoglobulina, especialmente en el caso de pruebas miniaturizadas, tales como inmunoensayos en un formato que comprende una serie de pruebas específicas, en algunos casos en formatos de prueba diferentes en un recipiente de reacción. Así, por ejemplo, la adición de un cierto detergente puede suprimir la unión no específica de anticuerpos, pero el mismo detergente puede no tener efectos, o incluso, el efecto opuesto en otra prueba en el mismo sistema de disposición. La utilización del factor de coagulación Clq, que es una subunidad del primer componente complementario como otra posibilidad de reducir señales de fondo en inmunoensayos, se da a conocer en el documento EP0222146B1. La proteína C1q unida a un soporte es utilizada en este caso para 20 eliminar selectivamente complejos inmunes circulantes *in vivo* de la sangre por medio de adsorción inmune extracorpórea, en la que complejos inmunes unidos a la proteína C1q son separados de los fluidos corporales por separación de la fase sólida. En el documento US5698449A1, se da a conocer un fragmento de C1q para eliminar selectivamente complejos inmunes de la sangre y para detectar y cuantificar los complejos inmunes. Además, el documento US4062935A1 describe la adición de factores reumatoides o C1q a la muestra, y la unión y 25 cuantificación de los complejos inmunes resultantes. No obstante, la técnica anterior descrita en esta descripción no muestra ninguna aplicación para inmunoensayos en formato de disposición (“array format”).

Una particularidad característica de los inmunoensayos en formato de disposición es la fase sólida. En estos métodos, la fase sólida consiste, preferentemente, en áreas de pruebas localizadas que comprenden áreas 30 definidas y discretas de la fase sólida, y que están separadas preferentemente de forma espacial de otras áreas de pruebas por áreas inertes. Estas áreas de prueba localizadas que están definidas como espacios (“spots”) tienen preferentemente un diámetro de 10 µm hasta 1 cm y con un diámetro especialmente preferente de 100-200 µm. Son preferibles fases sólidas que tienen varias áreas de pruebas, a las que se hace referencia también como sistemas de disposición (“array”). Estos sistemas de disposición se describen, por ejemplo, en Ekins y Chu (Clin. Chem. 37 (1991), 1955-1967) y en las patentes USA 5.432099, 5.516.635 y 5.126.276. Los sistemas de disposición tienen la ventaja de que pueden llevar a cabo, simultáneamente, a partir de una muestra varias determinaciones de 35 análisis. Por lo tanto, es posible aplicar una serie de miembros de unión, tales como anticuerpos específicos de antígenos al campo de prueba. La fase sólida de estos sistemas de disposición puede recubrir preferentemente con streptavidina o avidina, tal como se da a conocer en el documento EP0939319 (Hornauer y otros). Los componentes de muestra y, en particular, las IgG no específicas se pueden unir a todas estas fases sólidas. En este caso, es imposible utilizar un aditivo tampón universal para reducir las señales de fondo o, solamente es posible con un gran esfuerzo, puesto que cada miembro individual de unión requiere un aditivo tampón muy específico. Los aditivos tampón que tienen efectos positivos, en el caso de un miembro de unión, pueden tener incluso efectos adversos para otros miembros de unión. Asimismo, es muy difícil modificar la fase sólida para 40 diferentes miembros de unión. Dado que es imposible utilizar los métodos antes mencionados con un esfuerzo practicable para optimizar el valor de nulo, cuando se combinan varias o múltiples pruebas diferentes en una fase sólida “array”.

Por lo tanto, el objetivo era el de desarrollar un método para llevar a cabo un inmunoensayo para detectar anticuerpos específicos de antígeno en formato “microspot array” que evita ampliamente las desventajas de la técnica anterior y, en particular, reduce las señales de fondo debido a inmunoglobulinas unidas de manera no específica. 50

Este objetivo se consigue por el método, según la invención, para determinar anticuerpos específicos de antígeno de una clase de inmunoglobulina específica en una muestra por medio de un inmunoensayo en formato “microspot array”, en el que varios miembros de unión  $B_{nx}$  son unidos sobre diferentes áreas discretas sobre un soporte en el que  $B_{nx}$  contiene, en cada caso, los diferentes antígenos, que son capaces de unirse específicamente a los anticuerpos a detectar, incubando el soporte con la muestra eliminando el exceso de inmunoglobulina, e incubando con un miembro de unión  $B_2$ , que es un anticuerpo o fragmento del mismo y que lleva una etiqueta, y detectando 60 subsiguientemente la etiqueta en las respectivas áreas discretas, caracterizado porque se utiliza un miembro de unión como  $B_2$  que se une específicamente a anticuerpos de una cierta clase de inmunoglobulina que han sido unidos en forma específica de antígeno, mientras que las inmunoglobulinas unidas de manera no específica a la fase sólida no son detectadas o lo son solamente en proporción despreciable.

Se ha demostrado, de manera sorprendente, que la utilización de B<sub>2</sub>, de acuerdo con la invención, proporciona una elevada sensibilidad para anticuerpos específicos de antígeno de cierta clase de inmunoglobulina en el espacio del inmunoensayo en formato "array". La utilización, según la invención, de B<sub>2</sub> tiene como resultado la unión específica de principalmente anticuerpos de una determinada clase de inmunoglobulina, que han sido unidos en manera

5 específica de antígeno. A este respecto, B<sub>2</sub> reconoce preferentemente los anticuerpos específicos de antígeno del inmunoensayo en un formato "array" que están unidos de manera más densa en el espacio ("spot"), mientras que las inmunoglobulinas que están unidas de manera no específica a la fase sólida no son detectadas o lo son solamente en medida despreciable.

10 El método, según la presente invención, comprende las siguientes etapas:

- disponer un soporte de la prueba "microspot array" que tiene recubiertos campos de prueba en varias áreas discretas, cada una de las cuales contiene los diferentes antígenos B<sub>nx</sub> que son capaces de unirse específicamente a los anticuerpos a detectar,
- 15 - incubar el campo de pruebas con la muestra que contiene el analito a detectar, que es preferentemente un anticuerpo específico de antígeno,
- eliminar el exceso de inmunoglobulinas,
- 20 - incubar con el miembro de unión B<sub>2</sub> que lleva una etiqueta y que se une, solamente de forma específica, con anticuerpos de una cierta clase de inmunoglobulinas que han sido unidas de manera específica a antígeno,
- 25 - detectar el miembro de unión B<sub>2</sub> que está unido al analito a detectar.

También, se da a conocer la utilización de un miembro de unión B<sub>2</sub> que lleva una etiqueta y se une específicamente a anticuerpos de una cierta clase de inmunoglobulina que han sido unidos de manera específica a un antígeno en un inmunoensayo para detectar anticuerpos específicos a un antígeno en formato "microspot array" para reducir el valor de nulo.

30

Se utilizan anticuerpos, preferentemente, como miembro de unión B<sub>2</sub> en el método según la invención, que se unen específicamente a anticuerpos de una cierta clase de inmunoglobulina que se han unido de manera específica de antígeno. El anticuerpo contiene un lugar de unión y, preferentemente, varios de ellos (en los cuales se hace referencia también como paratopos, determinantes de antígeno o lugares de combinación) para la determinación del anticuerpo específico de antígeno, es decir, una estructura que reacciona inmunológicamente de manera específica con el anticuerpo IgG a determinar. B<sub>2</sub> se une preferentemente con anticuerpos agregados y/o oligomerizados unidos específicamente de una clase de inmunoglobulina particular que se encuentran presentes en elevada densidad en el espacio ("spot") y el inmunoensayo en formato "array". Los anticuerpos unidos de

35 manera no específica a la fase sólida que se encuentran presentes, principalmente, de manera individual y están distribuidos de manera libre, no se detectan por B<sub>2</sub> o solamente en medida despreciable.

40

La utilización del anticuerpos inmunocomplejos específicos para detectar inmunoglobulinas se ha descrito ya muchas veces en la técnica anterior. Los anticuerpos inmunocomplejos específicos son anticuerpos similares al factor reumatoide que se unen preferentemente a inmunoglobulinas agregadas u oligomerizadas, pero no a inmunoglobulinas individuales. El documento EP1098198 (Berti y otros) se refiere a un método para la determinación cualitativa y cuantitativa de anticuerpos de IgG humanas en inmunoensayos de enzimas. En este caso, se utiliza un anticuerpo monoclonal que se une específicamente con anticuerpos IgG humanos, a los que se ha unido un antígeno específico. Se forman nuevos epítomos o lugares de unión (los llamados neo-epítomos) cuando el antígeno se une al anticuerpo específico. No obstante, en el método descrito en este documento se observa que la unión selectiva a la molécula de IgG está asociada a una pérdida de señal. Además, no se muestra aplicación para sistemas automatizados, tales como los requeridos en particular para inmunoensayos en un formato "array". No se describe en este método la reducción de la señal de fondo debido a anticuerpos unidos de manera específica a la fase sólida.

55

En el método según la invención, los anticuerpos que tienen baja afinidad para unión a los anticuerpos específicos de antígeno, se utilizan preferentemente para B<sub>2</sub>. La afinidad de un anticuerpos para un epítopo se define como la intensidad de todas las interacciones no covalentes entre el lugar de unión de antígeno individual en un anticuerpo y el epítopo individual. Los anticuerpos con baja afinidad se unen débilmente y se disocian rápidamente, mientras que los anticuerpos con alta afinidad se unen de manera más intensa y permanecen unidos durante un periodo más largo. La afinidad en el lugar de unión no refleja siempre la verdadera intensidad de la interacción antígeno-anticuerpo, tal como, por ejemplo, en el caso de antígenos complejos con muchos determinantes antígenos repetidos y anticuerpos complementarios con varios lugares de unión. La interacción de antígeno y un lugar de unión de antígeno de un anticuerpo (o epítopo) en un lugar, incrementa la probabilidad de reacción de un segundo lugar de unión de antígeno del mismo anticuerpo, lo cual puede resultar en el cruzamiento de miembros de

65

interacción. La intensidad de estas interacciones múltiples entre el anticuerpo multivalente y antígeno se refiere como avidéz. Una elevada avidéz compensa una baja afinidad, tal como, por ejemplo, en el caso de la inmunoglobulina pentamérica IgM. En el método según la invención, un anticuerpo con baja afinidad para el anticuerpo específico de antígeno es utilizado preferentemente teniendo varios paratopos, por ejemplo, un mínimo

5 de dos, preferentemente, un mínimo de cuatro y, especialmente de forma preferente diez o más, tales como la inmunoglobulina IgM o inmunoglobulinas IgG que se entrecruzan entre sí. Son ejemplos de ello, los factores reumatoídes que se componen usualmente de moléculas IgM, y más raramente también de moléculas IgG, IgA y IgE. Los factores reumatoídes reaccionan con la parte Fc de los anticuerpos.

10 Un técnico medio conocedor de esta técnica sabe que el valor de la afinidad de un miembro de unión, preferentemente un anticuerpo está determinado por el coeficiente de afinidad definido por el modelo de Langmuir. Predice que el coeficiente de afinidad para una afinidad muy alta es aproximadamente de  $10^{-9}$  a  $10^{-11}$ , para una afinidad media de aproximadamente de  $10^{-8}$ , para una afinidad baja de aproximadamente de  $10^{-7}$  y para una afinidad muy baja de aproximadamente de  $10^{-6}$ . El miembro de unión B<sub>2</sub> de la presente invención posee una baja afinidad, el coeficiente de afinidad es aproximadamente de  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$ , estando determinado este rango por una reacción en un estudio analítico.

15 Si se utilizan estos anticuerpos de baja afinidad del miembro de unión B<sub>2</sub>, entonces B<sub>2</sub> reconoce solamente anticuerpos específicos de antígeno del inmunoensayo en un "array format" que están unidos densamente en un punto o espacio ("spot"). Las inmunoglobulinas que están unidas de manera no específica sobre la fase sólida que están dispuestas de manera libre, y distribuidas de forma no uniforme no son detectadas o solamente lo son en una proporción despreciable.

20 Si el anticuerpo unido de manera específica a detectar no se encuentra presente en el espacio o "spot" con una densidad específica, porque, por ejemplo, la muestra está muy diluida, es posible utilizar un anticuerpo para B<sub>2</sub> que se une específicamente a anticuerpos a los que se ha unido específicamente el antígeno. Cuando un antígeno está unido al anticuerpo específico, se forman aparentemente nuevos epítomos o lugares de unión (los llamados neo-epítomos). Estos anticuerpos contra anticuerpos unidos a antígenos se dan a conocer, por ejemplo, en el documento EP 1098198. En el caso, según la invención, un neo-epítomo puede ser descubierto por la unión de B<sub>2</sub> al anticuerpo que ha sido unido de manera específica de antígeno. Las uniones específicas de neo-epítomo no se forman en el caso de anticuerpos unidos de manera específica a la fase sólida, sino solamente en el caso de anticuerpos específicos de antígeno que están unidos al espacio del inmunoensayo en un "array format".

25 En el método según la invención, es también posible utilizar preferentemente fragmentos de anticuerpo para B<sub>2</sub> a efectos de unir los anticuerpos específicos de antígeno. La fragmentación de anticuerpos es conocida por los técnicos en la materia y es llevada a cabo por los métodos convencionales. La selección de estos fragmentos de anticuerpos, de acuerdo con su utilidad tiene lugar en la misma manera que se ha descrito para anticuerpos completos. Los fragmentos de anticuerpos consisten en componentes producidos de forma proteolíticamente clivada o recombinante de una molécula de anticuerpo que son capaces de reaccionar selectivamente con una cierta proteína. Son ejemplos de fragmentos proteolíticamente clivados y/o producidos de forma recombinante Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fv y anticuerpos de cadena única (scFv) que contienen un dominio V[L] y/o V[H] con un enlazador péptido. Los scFv pueden estar unidos de forma covalente o no covalente resultando en un anticuerpo con dos o más lugares de unión. La invención comprende también anticuerpos policlonales o monoclonales u otros preparados purificados de anticuerpos y anticuerpos producidos de forma recombinante.

30 En el método según la presente invención, el anticuerpo humano monoclonal <H-Agg.-IgG>M3.022.5-IgM-Dig es utilizado preferentemente para B<sub>2</sub>. Este anticuerpo de la clase de IgG de inmunoglobulina tiene las características de la clase general de anticuerpos reumatoídes, es decir, preferentemente se une de modo fuerte a anticuerpos de la clase de inmunoglobulina IgG que se han unido de manera específica de antígeno, dado que solamente reconoce los anticuerpos densamente empaquetados específicos de antígenos en el espacio del inmunoensayo en "array format". Una peculiaridad característica del anticuerpo <H-Agg.-IgG>M3.022.5-IgM-Dig es que las inmunoglobulinas que provocan el valor nulo, que están unidas de manera no específica a la fase sólida del conjunto que no son específicas para en antígeno, no se reconocen o solamente lo hacen en proporción despreciable. La utilización de <H-Agg.-IgG>M3.022.5-IgM-Dig reduce sustancialmente la señal de fondo en el conjunto y la dispone a un nivel constante de una muestra a otra.

35 Además, los anticuerpos monoclonales (MAB) de la clase de inmunoglobulinas IgM o IgG que se derivan de ratones, ovejas u otras especies, pueden ser utilizados también para B<sub>2</sub>. Éstos son conocidos por los técnicos en la materia. Los anticuerpos policlonales (PAB) de diferentes especies pueden ser utilizados también siempre que en todos los casos solamente se reconozcan anticuerpos que han sido unidos en forma específica de antígeno y los anticuerpos unidos de manera no específica a la fase sólida no son reconocidos.

40 Por lo tanto, otro objetivo de la presente invención es un método para reducir el valor de nulo ("blank") en un inmunoensayo en un formato de disposición ("array format") microspot, caracterizado porque se utiliza un miembro de unión como B<sub>2</sub> que se une específicamente a anticuerpos de una clase de inmunoglobulina particular que han sido unidos en forma específica de antígeno.

La utilización universal del anticuerpo B<sub>2</sub> posibilita desde varias pruebas distintas hasta un gran número de ellas que pueden ser combinadas en una fase sólida del conjunto. Una ventaja principal a este respecto es que solamente un compuesto tampón simple y universal es necesario. En el ejemplo 2, de acuerdo con la invención, se combinan dos pruebas en un formato de prueba indirecto con un ensayo sandwich de alta sensibilidad, prueba TSH. Una TSH (hormona de estimulación del tiroides) es una hormona involucrada en la regulación de la función del tiroides. Cuando se detecta TSH en un formato sandwich, se utiliza un anticuerpo etiquetado dirigido contra este antígeno.

La prueba de TSH es muy exigente en cuanto a la sensibilidad; pruebas de tercera generación pueden detectar concentraciones de hasta 10-14 M. Esta alta sensibilidad está afectada sustancialmente por la señal de fondo que debería ser lo más baja posible y preferentemente 0. Si las señales de fondo son elevadas, ya no es posible distinguir bajas concentraciones con respecto al fondo, resultando en una pérdida de sensibilidad. Por lo tanto, la prueba de TSH es una cantidad de medición ideal para optimizar los valores de nulo.

Se utilizan anticuerpos contra IgG en el proceso de pruebas para el miembro de unión B<sub>2</sub>, tal como el anticuerpo monoclonal <H-Agg.-IgG>M3.022.5-IgM-Dig. Se midieron elevadas señales de fondo con este anticuerpo en la prueba de TSH y también en los lugares de control del soporte de poliestireno donde no se había aplicado espacio ("spot") alguno. Además, el control negativo y la muestra de interferencia negativa produjeron señales de fondo todavía más altas con este anticuerpo en los dos formatos de prueba indirectos Jo-1 y Sc170.

El anticuerpo <H-Agg.-IgG>M3.022.5-IgM-Dig es un ejemplo de un anticuerpo IgG antihumano comercial que puede ser obtenido de varios proveedores. Por ejemplo, el MAB R10Z8E9 de la Universidad de Birmingham reconoce todas las subclases del IgG antihumano. Además, el MAB <h-IgG> que está dirigido específicamente contra todas las subclases para el ratón, se puede obtener de Pierce con el N° de pedido 37300ZZ y el el MAB <h-IgG> que reconoce las subclases IgG 1, 2 y 3 del ratón, se puede obtener de Calbiochem con el N° de pedido 411128.

Se ha descubierto de manera sorprendente, que al utilizar el miembro de unión B<sub>2</sub>, por ejemplo, el anticuerpo, según la invención <H-Agg.-IgG>M3.022.5-IgM-Dig contra IgG agregado fue posible reducir la unión no específica en medida tal que la señal de fondo se redujo a una proporción satisfactoria en el ensayo sándwich de alta sensibilidad de TSH y también en los formatos de pruebas indirectos. Las señales de fondo se consideraron reducidas o que ya no existían con este miembro de unión B<sub>2</sub> o incluso en los controles "global de fondo", control negativo y muestra de interferencia negativa.

En el método, según la invención, una serie de miembros de unión (B<sub>nx</sub>) se aplican al inmunoensayo en un formato de conjunto ("array format") en el que B<sub>nx</sub> contiene en cada caso los antígenos diferentes que son capaces de unirse específicamente a los anticuerpos a detectar. Se hace referencia a este método, asimismo, como formato de prueba indirecto o formato deducido de antígeno ("antigen-down"). En el método según la invención, el conjunto consiste preferentemente en un soporte realizado a base de un metal, vidrio o plástico o poliestireno. Se utiliza preferentemente en el método según la invención soportes de poliestireno conocidos por los técnicos en la materia y descritos, por ejemplo, en el documento EP0939319 (Hornauer y otros).

Los miembros de unión son inmovilizados en áreas discretas del soporte que se definen como campos de prueba que están separados espacialmente uno de otro. Campos de pruebas que comprenden uno o varios espacios, conteniendo el mismo miembro de unión B<sub>nx</sub>, pueden encontrarse presentes preferentemente sobre el soporte, por ejemplo, se pueden formar líneas que consisten en varios espacios idénticos. Los métodos para inmovilizar los miembros de unión B<sub>nx</sub> son conocidos de los técnicos de la materia y son dados a conocer, por ejemplo, en el documento EP0939319 (Hornauer y otros). El método descrito aquí se refiere a un método para proporcionar áreas de prueba claramente definidas espacialmente para ensayos de unión. Para la determinación cualitativa y cuantitativa fiables de un analito es necesario ser capaz de producir las áreas de pruebas de los ensayos de unión de manera reproducible y con cantidades exactamente definidas de moléculas receptoras. El documento EP0939319 (Hornauer y otros) describe que aplicando recubrimiento de capaz múltiples es posible obtener áreas de pruebas definidas de manera clara espacialmente para un ensayo de unión. Los recubrimientos comprenden la aplicación de un pre-recubrimiento sobre un campo de reactivo del soporte sólido, lavar el soporte con pre-recubrimiento y aplicar un segundo recubrimiento que comprende moléculas receptoras que son capaces de unirse al pre-recubrimiento. El pre-recubrimiento contiene preferentemente un primer miembro de un par de unión de alta afinidad, tal como estreptavidina, avidina o biotina, así como análogos, derivados y conjugados de las sustancias antes mencionadas o anticuerpos tales como anticuerpos antirratón. No obstante, es también posible aplicar moléculas como pre-recubrimiento que están destinadas a unirse de forma covalente al segundo recubrimiento, tal como moléculas que contienen una amina, un sulfuro o un grupo sililo. Además, en el documento EP0939319 (Hornauer y otros) se mostró que se podían contener espacios de prueba homogéneos, reproducibles, al lavar el soporte dotado de pre-recubrimiento con un tampón con baja fuerza iónica. Un segundo recubrimiento conteniendo moléculas receptoras capaces de unirse al pre-recubrimiento es aplicado al pre-recubrimiento lavado en forma de áreas especialmente definidas sobre el campo de reactivo. Las moléculas de receptor contienen preferentemente el segundo miembro del par de unión que puede sufrir una interacción de alta afinidad, por ejemplo, una reacción inmunológica, una interacción estreptavidina/avidina o similar o también una unión covalente con el

primer miembro del par de unión que es aplicado como pre-recubrimiento. Así, por ejemplo, se pueden aplicar estreptavidina o avidina en un pre-recubrimiento y la molécula receptora contiene un componente de biotina.

5 En el presente método, de acuerdo con la invención, la suma de todos los miembros de unión o antígenos a detectar de todos los campos de prueba se define como  $B_{nx}$  ( $B_{nx} = B_{n1} + B_{n2} + B_{n3}, \dots$ etc.). Por lo tanto, cada campo de prueba contiene un cierto tipo de  $B_{nx}$ , por ejemplo, el campo de prueba 1 contiene el miembro de unión o antígeno  $B_{n1}$ , el campo de prueba 2 contiene el miembro de unión o antígeno  $B_{n2}$ , el campo de prueba 3 contiene el miembro de unión o antígeno  $B_{n3}$ , etc. De este modo, cada campo de prueba no contiene una mezcla de distintos antígenos  $B_{nx}$ , sino un tipo específico de un miembro de unión. Los miembros de unión específicos pueden encontrarse  
10 presentes en varios campos de prueba, por ejemplo, en una fila, de manera que se pueden encontrar presentes varios espacios idénticos. En caso deseado, es también posible utilizar espacios mixtos, es decir, diferentes antígenos que están contenidos en un campo de pruebas. Por lo tanto, el método, según la invención, proporciona un método de detección universal, dado que los anticuerpos específicos de antígeno que son capaces de unirse específicamente a una serie de miembros de unión ( $B_{nx}$ ) pueden ser detectados solamente con un miembro de unión  $B_2$ .

En el ejemplo, según la invención, se detectan, por ejemplo, autoanticuerpos contra los antígenos antinucleares Sc170. El anticuerpo contra Jo-1 está dirigido contra la enzima histidil-ARNt sintetasa, mientras que Sc170 es un marcador de esclerodermia.

20 Los anticuerpos antinucleares (ANA) son autoanticuerpos que están dirigidos contra varios componentes celulares, tales como, por ejemplo, el llamado factor LE factor en Lupus erithematoides visceralis. La especificidad de estos factores antinucleares (ANF) es muy heterogénea; hasta el momento, se conocen más de 30 antígenos que reaccionan con ANF, éstos son conocidos por los técnicos en la materia y se describen, por ejemplo, en el Biotest -  
25 Dictionary of Immunology – en la página 145. El método, de acuerdo con la invención, puede ser utilizado también para detectar autoanticuerpos, es decir, anticuerpos antinmunes típicos y también antígenos antitiroideos, antígenos celulares antisletas, etc. Además, el método posibilita también la detección de anticuerpos contra ciertos patógenos, tales como infecciones por infecciones por toxoplasmosis, rubéola y clamidia.

30 El miembro de unión  $B_2$  es detectado en el método, según la presente invención, por métodos conocidos en la materia. Para ello, una etiqueta es unida al miembro de unión  $B_2$ . Todas las etiquetas conocidas por un técnico en la materia que permiten etiquetado específico del lugar de los espacios ("spots") pueden ser utilizadas. Una sustancia directamente detectable es utilizada preferentemente como etiqueta, tal como una sustancia quimioluminiscente, fluorescente o radioactiva, o partículas de un sol de metal, látex u oro. Los métodos para etiquetar el miembro de  
35 unión  $B_2$  son conocidos por los técnicos en la materia y no requieren explicación adicional. La etiqueta es detectada directamente de manera conocida por medición de la sustancia quimioluminiscente, fluorescente o radioactiva, o las partículas de sol de metal, látex u oro y se describen en los documentos US0017616 (Karl y otros), 0304202B1, EP0736176 B1, EP0608370 B1 (Ekins y otros), EP0939319 (Hornauer y otros).

40 La etiqueta puede ser también detectada indirectamente. En este caso, el miembro de unión que está asociado por su parte al grupo generador de señal se une específicamente a una etiqueta de  $B_2$ , por ejemplo, un hapteno, tal como digoxigenina. El grupo generador de señal, por ejemplo, una sustancia quimioluminiscente, fluorescente o radioactiva o una enzima o una partícula de oro, es detectada por métodos conocidos por los técnicos en la materia. Se puede utilizar, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a la etiqueta  
45  $B_2$ , por ejemplo, como miembro de unión adicional, por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra digoxigenina o contra el hapteno.

En el método según la invención, el miembro de unión  $B_{nx}$  está unido a una fase sólida. En este caso,  $B_{nx}$  puede estar unido directamente a la fase sólida.  $B_{nx}$  está unido directamente a la fase sólida por métodos conocidos por los  
50 técnicos en la materia.  $B_{nx}$  puede estar unido también indirectamente a la fase sólida por medio de un sistema de unión específico. En este caso,  $B_{nx}$  es un conjugado que contiene el antígeno y un miembro de reacción de un sistema de unión específico. En este caso, se comprende un sistema de unión específico como dos miembros que reaccionan específicamente entre sí. La capacidad de unión puede basarse en este caso en una reacción inmunológica o en otra reacción específica. Estos miembros de la reacción y su utilización en inmunoensayos para  
55 recubrimiento de soportes de prueba con antígenos o anticuerpos específicos son conocidos por los técnicos en la materia. Una combinación de biotina y avidina, o, biotina y estreptavidina se utiliza preferentemente como sistema de unión específico. Otras combinaciones preferentes son biotina y antibiotina, hapteno y antihapteno, fragmento Fc de un anticuerpo y anticuerpo contra este fragmento de FC o carbohidrato y lectinas. Uno de los miembros de reacción de este par de unión específico es entonces parte del conjugado que forma el miembro de unión  $B_{nx}$ . El otro miembro de reacción del sistema de unión específico está unido al soporte. La unión del otro miembro de reacción del sistema de unión específico a un material de soporte puede ser llevado a cabo utilizando métodos habituales conocidos por los técnicos en la materia. En este caso, es apropiada una unión covalente y también una unión adsorbente.

Todos los fluidos biológicos conocidos por los técnicos en la materia pueden ser utilizados como muestras. Los fluidos corporales tales como sangre entera, suero de la sangre, plasma de la sangre, orina, saliva, licores, pueden ser utilizados preferentemente como muestra.

- 5 Además de la muestra, la fase sólida y los receptores antes mencionados, las mezclas de prueba pueden contener aditivos requeridos para las aplicaciones, tales como tampones, sales, detergentes aditivos de proteínas, tales como BSA. Los aditivos requeridos son conocidos por los técnicos en la materia o los podrá encontrar de manera simple.

- 10 Además, la invención se refiere a un kit de pruebas para determinar anticuerpos específicos de antígeno de una cierta clase de inmunoglobulina en una muestra por medio de un inmunoensayo en un formato "microspot array" que contiene un soporte sobre el que se unen varios miembros de unión  $B_{n \times}$  sobre diferentes áreas discretas, de reactivos de detección en contenedores separados, así como, el miembro de unión  $B_2$  que lleva una etiqueta y que une específicamente anticuerpos de una clase de inmunoglobulina particular, que han sido unidos de manera específica de antígeno. El kit de pruebas contiene también controles y estándares y reactivos en una y/o varias soluciones que contienen aditivos de pruebas comunes, tales como tampones, sales, detergentes, etc. conocidos por los técnicos en la materia.

La invención se explica adicionalmente por los ejemplos siguientes.

## 20 Ejemplo 1

Producción de anticuerpos IgM de ratón monoclonales con especificidad de tipo factor reumatoide.

Inmunógeno: polímero H-IgG

- 25 10 mg de IgG1 humano (Sigma Company) se disuelven en 0,6 ml de tampón bicarbonato 25 mM a pH 9,5. Después de añadir 3,5  $\mu$ l de solución de glutardialdehído al 12,5% se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación se enfría en un baño de hielo ajustado a pH 8,3 con 50 mM de solución de trietanolamina con pH 8,0 y 0,15 ml de solución recién preparada de hidruro de boro (8 mg de hidruro de boro/ml de agua). Después de 2,5 horas a 0°C se dializa el preparado durante 16 horas a 4°C contra 10 mM de tampón de fosfato potásico/0,2 M de NaCl, pH 7,5. El dializado que contiene polímero de IgG se almacena en partes alícuotas a -80°C o se usa para inmunización y para pruebas de especificidad en sobrenadantes de cultivo de células de hibridoma.

El polímero H-IgG3 se produce de manera similar empezando de IgG3 humano (Sigma Company).

## 35 Inmunización de ratones

- Ratones de 12 semanas de edad, hembra, Balb/c inmunizadas en primer lugar de forma intraperitoneal con 100  $\mu$ g de polímero H-IgG1 o IgG3 junto con el coadyuvante CFA (coadyuvante completo de Freund). Después de 8 días se lleva a cabo otra inmunización con 100  $\mu$ g del correspondiente polímero IgG en CFA. 13 días después de la inmunización inicial, 200  $\mu$ g del polímero correspondiente son administrados intraperitonealmente sin coadyuvante, 14 y 15 días después de la inmunización inicial, se administraron 100  $\mu$ g en cada caso, intraperitonealmente e intravenosamente. La fusión se lleva a cabo después de 16 días.

## 45 Producción de clones de hibridoma

Fusión y clonado

- 50 Se fusionan células de bazo de un ratón inmunizado con células de mieloma siguiendo el método de Galfré, *Methods in Enzymology* 73, 1981, 3. Se mezclaron aproximadamente  $1 \times 10^8$  células del bazo del ratón inmunizado con  $2 \times 10^7$  células de mieloma (P3X63-Ag8-653, ATCC CRL 1580) y se centrifugó (10 min a 300 g y 4°C). Las células son lavadas a continuación con medio RPMI-1640 sin suero fetal de vaca (FCS) y se centrifuga nuevamente a 400 g en un tubo cónico de 50 ml. Se añadió 1 ml de PEG (polietileno glicol) (peso molecular 4000, Merck, Darmstadt) y se mezcló por pipeteado. Después de 1 min en baño de agua a 37°C, se añadieron gota a gota 5 ml RPMI 1640 sin FCS, se llenó hasta 50 ml con medio (RPMI 1640 + 10 % FCS) y a continuación se centrifugó. Las células sedimentadas son recogidas en medio RPMI 1640 conteniendo 10% de FCS y se siembran en un medio de selección de hipoxantina-azaserina (100 mmol/l hipoxantina, 1 Pg/ml azaserina in RPMI 1640 + 10 % FCS). Se añade Interleukina 6 (100 U/ml) al medio como factor de crecimiento. Unos 10 días después, los cultivos primarios fueron comprobados en cuanto a síntesis de anticuerpo específico. Los cultivos primarios que muestran reacción positiva con IgG1 humano agregado, pero no muestran reacción cruzada con IgG monómero son clonados por medio de un clasificador de células activado por fluorescencia en placas de cultivo de células de 96 pocillos. La Interleukina 6 (100 U/ml) es añadida al medio como aditivo de crecimiento.

Se obtuvieron los siguientes clones de hibridoma de este modo:

65



Tabla 1:

nombre MAB	Inmunógeno	Especificidad subclase
MAB<H-Agg.-IgG>M-3.022.5-IgM	polímero de H-IgG1	IgG1>IgG3>IgG4>IgG2
MAB<H-Agg.-IgG>M-1.010.2-IgM	polímero de H-IgG1	IgG1>IgG3>IgG4>IgG2
MAB<H-Agg.-IgG>M-1.1.7-IgM	polímero de H-IgG3	IgG1>IgG3>IgG2>IgG4

Prueba de rastreo para anticuerpos monoclonales con especificidad para IgG humano, agregado.

5 Se recubre MTP recubiertos de estreptavidina con IgG1 o IgG3 humano biotinilado. Posteriormente, son incubados con el anticuerpo monoclonal en el sobrenadante de cultivo de células. A continuación, los anticuerpos unidos son detectados de la manera usual utilizando un IgM-POD antiratón por reacción con sustrato POD.

10 Determinación de la especificidad de la subclase utilizando IgG humano unido a una fase sólida.

Para determinar la especificidad de los anticuerpos en el sobrenadante de cultivo de las células de hibridoma, se recubren MPT (Placas de Micro Titulación) recubiertas con estreptavidina recombinante (MicroCoat Company, N° de pedido 12-K 96 N) con 1 µg/ml de h-IgG (=H-IgG-Bi) biotinilado de subclase 1 o 2 o 3 o 4 en tampón de incubación. Dado que IgG unida a través de biotina a una fase sólida se comporta como IgG polímera, agregada, este sistema experimental puede ser utilizado para determinar la especificidad de la subclase. Para ello, se incuban 100 µl de solución H-IgG-Bi por pocillo durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación y se efectúa subsiguientemente lavado 3 veces con 0,9% NaCl / 0,05% Tween 20.

20 En la fase siguiente, 100 µl de la solución de anticuerpo a examinar (sobrenadante de cultivo) se añaden a un pocillo dotado de recubrimiento y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Después de lavar 3 veces con solución al 0,9% de cloruro sódico / 0,05% Tween 20, 100 µl de un fragmento etiquetado POD (Fab')<sub>2</sub> de un anticuerpo policlonal de IgM de cabra contra ratón (Dianova Company, N° de pedido 115-036-075, concentración utilizada 0,16 µg/ml de tampón de incubación) se añaden en cada caso para detectar anticuerpo único de la muestra, incubado durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación y lavado posteriormente 3 veces con solución de cloruro sódico a 0,9% / 0,05% Tween® 20.

Finalmente, se añaden 100 µl/pocillo de sustrato ABTS® (Roche Diagnostics GmbH, N° de pedido 1684 302) y se mide la absorbancia a 405/492 nm después de 30 minutos a temperatura ambiente en un lector de microplacas MR700 de Dynatech Company.

Tampón de incubación: 40 mM Na fosfato pH 7,4  
200 mM Na tartrato  
0,1% Tween 20  
0,2% albumina de suero bovino

Determinación de la reactividad/reacción cruzada con IgG1 humano monómero.

40 Para determinar la reactividad/reacción cruzada con H-IgG1, no agregado, monómero, el anticuerpo monoclonal a examinar es preincubado en la prueba descrita anteriormente con IgG1 no agregado, monómero en concentraciones crecientes o en exceso. Si la señal medida sigue sin cambiar a elevado nivel, no hay reacción cruzada. Si la señal medida disminuye, ha tenido lugar reacción cruzada.

45 Para ello, se recubren placas de microtitulación (MTP) (MicroCoat Company, N° de pedido 12-K 96 N) recubiertas con estreptavidina recombinante, con 1 µg/ml de H-IgG1 (=H-IgG1-Bi) biotinilado en tampón de incubación, se utilizan 100 µl de la solución de H-IgG1-Bi por pocillo, y se incuba durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación, y se lava posteriormente 3 veces con 0,9% NaCl / 0,05% Tween 20.

50 El anticuerpo monoclonal a comprobar, a cuanto a reacción cruzada es preincubado con concentraciones serie de hasta 1 µg/ml de IgG1, no agregado, monómero. La preincubación tiene lugar en placas MTP de 96 pocillos sin recubrimiento (placas de microtitulación) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación.

55 En la siguiente etapa, 100 µl de esta solución (anticuerpo + IgG1 monómero en exceso, no agregado) se añade a un pocillo dotado de recubrimiento, y es incubado durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Después de lavado 3 veces con 0,9% de cloruro sódico / 0,05% Tween 20, se añaden 100 µl de un fragmento etiquetado POD (Fab')<sub>2</sub> de un anticuerpo policlonal del IgM de cabra contra ratón (Dianova Company, N° de pedido 115-036-

075, concentración utilizada 0,16 µg/ml) en cada caso para detectar anticuerpo unido de la muestra, se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación y, a continuación, se lava 3 veces con una solución de cloruro sódico a 0,9% / 0,05% Tween® 20.

- 5 Finalmente, se añaden 100 µl/pocillo de sustrato ABTS® (Roche Diagnostics GmbH, Order N° de pedido 1684 302) y se mide la absorbancia a 405/492 nm después de 30 min a temperatura ambiente en un lector de microplacas MR700 de Dynatech Company.

10 Los anticuerpos de unión similares al factor reumatoide monoclonal que son adecuados en el sentido de la invención, reconocen todas las subclases de IgG humana y muestran menos de 10% de reacción cruzada con H-IgG monómero en una prueba de competición. Si se utiliza polímero H-IgG1 para determinar la reactividad, la señal medida se reduce notablemente. La tabla 1 muestra las características principales de los anticuerpos monoclonales encontrados.

15 Fermentación de clones de hibridoma para aislar anticuerpos monoclonales

20 Las células de hibridoma que son obtenidas, tal como se ha descrito en el capítulo de fusión y clonado, son sembradas con una densidad de  $1 \times 10^5$  células por ml en medio RPMI 1640 que contiene 10% de FCS y se propagaron durante 7 días en un fermentador (Thermodux Company, Wertheim/Main, model MCS-104XL, N° de pedido 144-050). Se alcanzaron concentraciones promedio de 100 µg de anticuerpo monoclonal por ml en el sobrenadante del cultivo.

Aislamiento de MAB<H-Agg.-IgG>M-3,022,5-IgM monoclonal

25 70 g de polietileno glicol finalmente molido 6000 (Merck Company) son añadidos a temperatura ambiente a 1 litro de sobrenadante de cultivo conteniendo >50 µg /ml del IgM monoclonal fermentado. El IgM que precipita después de 45 min es sedimentado por centrifugación, y disuelto en 50 ml de tampón TRIS (20 mM TRIS / 0,2 M NaCl / 25 mM glicina/2% sacarosa, pH 8). Se precipita IgM en una segunda tanda de esta solución utilizando 6,5% de polietileno glicol 6000, sedimentando por centrifugación. El precipitado es disuelto en 5 ml de tampón TRIS y dializado contra el mismo tampón.

30 El dializado es centrifugado hasta su transparencia y cromatografiado sobre columna de Superosa 6 (Amersham Biosciences Company) con un volumen del lecho 350 ml. El tampón operativo es 75 mM HEPES / 0,25 M NaCl/3% sacarosa, pH 7,5. Las fracciones del pico de IgM que tienen un peso molecular de 900 000 son reunidas y concentradas por ultrafiltrado a 5 mg/ml. La solución de IgM es almacenada en partes alícuotas a -80°C.

Preparación de H-IgG (=H-IgG-Bi) biotinilado

40 5 mg de H-IgG de subclase 1 o 2 o 3 o 4 (Sigma Company) disueltos en 0,2 ml de 0,1 M fosfato sódico tampón, pH 8,3, son mezclados con 50 µl de una solución 2,67 mM de una solución de ester de ácido biotinylamino-3,6 dioxaoctanylaminocarbonylheptanoic -N hydroxi succinimida en dimetil sulfoxido con agitación durante 60 min a 25°C. La proporción de IgG para activar biotina es 1:4. El IgG-Bi que se forma es dializado a 4°C contra 20 mM fosfato potásico tampón/0,1 M NaCl/3% sacarosa, pH 7,5. El IgG-Bi es almacenado en partes alícuotas a -80°C.

45 Preparación de MAB<H-Agg.-IgG>M-3.022.5-IGM-digoxigenin (IgM-Dig)

50 5 mg de MAB<H-Agg.-IgG>M-3.022.5-IgM son ajustados hasta un volumen total de 2 ml con 0,1 M fosfato sódico tampón, pH 8,6. Se añaden 50 µl de una solución 1,11 mM de ester de ácido digoxigenin-3-O-metil-carbonil-ε-aminocaproico y N hidroxisuccinimida en dimetil sulfoxido a esta solución, y a continuación se agita durante 60 min a 25°C. La proporción de IgM a la digoxigenina activada es 1:10. La IgM-digoxigenina que se forma es dializada contra 20 mM de fosfato potásico tampón/ 0,1 M NaCl/ 3% sacarosa, pH 7,5. La IgM-Dig dializada es almacenada en partes alícuotas a -80°C.

Ejemplo 2

55 Se aplica un recubrimiento de estreptovidina sobre toda el área de un área de pruebas de unos 2,5 x 6 mm sobre un soporte de poliestireno marcado en negro. Se aplican líneas de puntos idénticos de aproximadamente 20 por línea, consistiendo en antígenos biotinilados al área de prueba en un proceso de chorros de tinta; el diámetro por punto es aproximadamente de 150 µm. A continuación, la muestra es diluida con un tampón de dilución de muestra en una proporción de 1:10 y se pipetea manualmente 40 µl de la muestra diluida en el área de prueba respectiva del ensayo. El proceso de ensayo restante tubo lugar en un incubador lavador de laboratorio de panel ("bread board").

65 Se utilizaron los siguientes reactivos específicos de la prueba:

Tampón de dilución muestra: 50 mM Tris, pH 7,6; 150 mM NaCl; 0,1% de detergente (polidocanol);  
0,6% BSA; 0,2% conservante (oxipirion y cloridrato de metilisotiazolona (MIT))

5 Tampón de lavado: 10 mM Tris, 0,01% polidocanol, 0,001% oxipirion, 0.001 % MIT

Muestras: sueros humanos, muestras positivas comercialmente disponibles; las muestras negativas son de donantes internos

10 Se utilizaron Jo1 natural y Sc170 natural como antígenos biotinilados. Autoanticuerpos contra estos antígenos antinucleares fueron detectados en un formato de prueba indirecto. Se utilizaron 100 µg/ml del antígeno biotinilado respectivo en cada solución puntual. Además, también se llevó a cabo la prueba TSH antes descrita en este ejemplo, para comprobar las ventajas de la invención. La prueba de TSH presenta las mayores exigencias en la  
15 sensibilidad de un sistema de ensayo, por lo tanto, es el parámetro ideal para optimizar el valor de nulo.

Descripción del procedimiento de pruebas:

20 Las muestras fueron incubadas durante 6 min a 37°C. Después de aspirar la muestra y lavar el campo de pruebas con tampón de lavado, se incubó con el miembro de unión B<sub>2</sub>, un anticuerpo etiquetado con digoxina durante 3 min a 37°C con una etapa subsiguiente de lavado. Después de incubado con un anticuerpo marcado fluorescentemente de <Dig> durante 3 min a 37°C y lavando posteriormente y secando por succión el campo de pruebas, se detectaron las señales mediante una cámara CCD. Las muestras fueron diluidas 1:10 con el tampón de dilución de la muestra para la medición.

25 Tabla 2: Resultado de pruebas cuando se utiliza el anticuerpo humano monoclonal <H-IgG PAN>M-R10Z8E9-IgG-Dig como miembro de unión B<sub>2</sub>:

Formato de ensayo puntual	MAB<TSH> sandwich	Jo-1 indirecto	Sc170 indirecto	Global de fondo
Control negativo	406	2123	25	226
Muestra con interferencia negativa	293	3107	59	660
Jo-1 positivo 9501	763	26551	0	272
Sc170 positivo 5510	161	716	10654	401

30 Las señales mostradas en la tabla 2 fueron conseguidas utilizando el anticuerpo monoclonal <H IgG PAN>M-R10Z8R9-IgG-Dig tal como se ha descrito en lo anterior, como ejemplo de anticuerpo de acuerdo con el estado de la técnica. Cuando se utiliza este anticuerpo se encontraron señales de fondo extremadamente altas en la prueba TSH y también en lugares del soporte de poliestireno, en los que no se habían aplicado espacios ("spots") ("global de fondo", columna de la derecha de Tabla 2). El control negativo y la muestra de interferencia negativa mostraron  
35 señales de fondo, incluso, más elevadas con este anticuerpo en los dos formatos de prueba Jo-1 y Sc170. Como resultado de estas señales de fondo muy elevadas, no es posible medir concentraciones bajas de analito, puesto que se superponen señales bajas de muestras débilmente positivas por la señal de fondo. Como resultado, la sensibilidad de la prueba, utilizando el anticuerpo <H IgG PAN>M-R10Z8R9-IgG-Dig, no es adecuada para  
40 aplicación de laboratorio de diagnóstico de rutina.

Tabla 3: Resultado de pruebas utilizando el anticuerpo humano monoclonal <H-Agg.-IgG>M3.022.5-IgM como miembro de unión B<sub>2</sub>:

Formato de ensayo puntual	MAB<TSH> sandwich	Jo-1 indirecto	Sc170 indirecto	Global de fondo
Control negativo	29	364	7	38
Muestra con interferencia negativa	4	449	21	41
Jo-1 positivo 9501	0	28487	0	74
Sc170 positivo 5510	0	41	9623	54

45

5 Las señales mostradas en la tabla 3 fueron obtenidas utilizando el anticuerpo Mab<H-Agg.-IgG>M3.022.5-IgM. En este experimento, la señal de fondo fue substancialmente reducida, y tenía un nivel uniforme de una muestra a otra, alcanzando la sensibilidad los límites deseados. En el ensayo sandwich (TSH) y las pruebas indirectas (Jo-1 y Sc170) la unión no específica ya no es detectable, o solamente lo es en una medida despreciable en el control negativo y la muestra de interferencia negativa. Asimismo, la señal de fondo "global de fondo" fue considerablemente reducida por este anticuerpo.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la determinación de anticuerpos específicos de antígeno de una clase de inmunoglobulina específica en una muestra por medio de un inmunoensayo en formato "microspot array", en el que varios miembros de unión  $B_{nx}$  son unidos sobre diferentes áreas sobre un soporte en el que  $B_{nx}$  contiene, en cada caso, los diferentes antígenos que son capaces de unirse específicamente a los anticuerpos a detectar al incubar el soporte con la muestra, retirando el exceso de inmunoglobulina e incubando con un miembro de unión  $B_2$  que es un anticuerpo o un fragmento del mismo y que lleva una etiqueta, y detectando subsiguientemente la etiqueta sobre las respectivas áreas discretas, caracterizado porque se utiliza un miembro de unión como  $B_2$  que se une específicamente a anticuerpos de una cierta clase de inmunoglobulina que han sido unidos en forma específica de antígeno mientras que las inmunoglobulinas que están unidas de manera no específica a la fase sólida no son detectadas o lo son solamente en una magnitud despreciable.
- 15 2. Método, según la reivindicación 1, caracterizado porque  $B_2$  es un anticuerpo que se une a un nuevo epítipo o lugar de unión de un anticuerpo, formado cuando el antígeno se une al anticuerpo específico.
3. Método, según la reivindicación 1, caracterizado porque  $B_2$  es un anticuerpo que tiene baja afinidad, que tiene, como mínimo, dos, preferentemente, un mínimo de 4 y en particular preferentemente 10 o más paratopos.
- 20 4. Método, según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque se utiliza biotina/estreptavidina, biotina/avidina, hapteno/antiapteno, fragmento de Fc de un anticuerpo/anticuerpo contra este fragmento Fc, o carbohidrato/lecitina como sistema de unión específico para la unión de  $B_{nx}$  a la fase sólida.
- 25 5. Método, según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el miembro de unión  $B_2$  es etiquetado con una sustancia quimioluminiscente, fluorescente o radioactiva.
- 30 6. Método para reducir el valor de nulo en un inmunoensayo para la detección de anticuerpos de una clase específica en un formato "microspot array", en el que varios miembros de unión  $B_{nx}$  son unidos en diferentes áreas discretas sobre un soporte, según la reivindicación 1, caracterizado porque se utiliza un miembro de unión como  $B_2$  que es un anticuerpo o fragmento del mismo y que lleva una etiqueta y que une específicamente anticuerpos de una determinada clase de inmunoglobulina que han sido unidos de manera específica de antígeno.
- 35 7. Kit de pruebas para determinar anticuerpos específicos de antígeno de una cierta clase de inmunoglobulina en una muestra por medio de un inmunoensayo, caracterizado por un formato "microspot array" conteniendo un soporte sobre el que están unidos varios miembros de unión  $B_{nx}$  sobre diferentes áreas discretas, reactivos de detección en contenedores separados, así como, el miembro de unión  $B_2$  que es un anticuerpo o un fragmento del mismo y que lleva una etiqueta y une específicamente anticuerpos de una clase de inmunoglobulina específica que han sido unidos de manera específica de antígeno.