

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 529**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2010** **E 10794167 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.02.2015** **EP 2450709**

54 Título: **Reactivo de medición inmunológica para su uso en la medición de KL-6**

30 Prioridad:

30.06.2009 JP 2009155075

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

12.05.2015

73 Titular/es:

SEKISUI MEDICAL CO., LTD. (50.0%)

13-5, Nihonbashi 3-chome Chuo-ku

Tokyo 103-0027 , JP y

EIDIA CO., LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

KONDOU, JUNICHI;

YAMAMOTO, MITSUAKI y

KANEKO, CHIE

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 535 529 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

Reactivo de medición inmunológica para su uso en la medición de KL-6

5 **Campo técnico**

El campo técnico de esta invención se refiere a un reactivo de ensayo y a un ensayo para la medición de KL-6 en una muestra. Además, el campo técnico de la presente invención se refiere a una técnica de inmunoaglutinación, a reactivos y a métodos para inhibir reacciones no específicas en esta técnica.

10

Antecedentes de la técnica

KL-6 es un antígeno de hidrato de carbono sialilado que está implicado en fibrosis pulmonar (documento no de patente (DNP) 1, documento de patente (DP) 1). Los niveles de KL-6 se miden para el diagnóstico y la determinación de estrategias terapéuticas para neumonía intersticial dado que niveles de KL-6 elevados y su fluctuación en neumonía intersticial indican un estado patológico (DP 1). Se han dado a conocer un método de predicción de la aparición de neumonía intersticial provocada por la administración de interferón mediante la medición de niveles de MUC-1/KL-6 en suero (DP 2), un método de examen de pronóstico en pacientes con cáncer de pulmón mediante la medición de KL-6 (DP 3) y un método de detección de carcinoma mucinoso papilar intraductal o cáncer de páncreas mediante la medición de KL-6 en jugo pancreático (DP 4). En los últimos años, ha aumentado la necesidad de la medición de KL-6 para el diagnóstico y la determinación de estrategias terapéuticas para neumonía intersticial incluyendo neumonía intersticial inducida por fármacos, neumonía intersticial inducida por trastorno del colágeno, etc., diagnóstico de pacientes con cánceres de pulmón, de páncreas, etc., y diagnóstico y determinación de estrategias terapéuticas para neumonía intersticial en pacientes tratados con preparación de anticuerpos para artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, artritis idiopática juvenil generalizada, enfermedad de Castleman, etc.

En los documentos de patente 1-4, se ha usado el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (a continuación en el presente documento, método ELISA) para la medición de KL-6. Aunque ELISA es un método fiable, el ensayo de inmunoaglutinación de látex es superior para pruebas rápidas, fáciles y económicas de un gran número de muestras y se usa ampliamente como reactivo clínico para medir componentes traza.

Sin embargo, cuando una muestra que contiene el factor reumatoide se somete a prueba mediante un método de medición inmunológica tal como ELISA o inmunoaglutinación de látex, la aparición de una reacción no específica debida a interferencia a partir del factor reumatoide dependiente de la muestra es un problema conocido (DNP 2). Además, la aparición de una reacción no específica debida a interferencia a partir de anticuerpos heterófilos (anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón: HAMA, etc. y anticuerpo anti-inmunoglobulina de cabra: HAGA, etc.) es un problema conocido.

Se conoce que un método que elimina la parte de Fc del anticuerpo unido al látex, un método que usa un anticuerpo que se une al factor reumatoide (DP 5) y otros métodos similares inhiben la interferencia a partir del factor reumatoide en el ensayo de inmunoaglutinación de látex.

El DNP 3 da a conocer un ensayo de aglutinación de látex para anticuerpos humanos anti-IgM de *Brucella*; el DNP 4 da a conocer un inmunoensayo de látex turbidimétrico para ferritina sérica; el DNP 5 da a conocer un inmunoensayo de látex de alfa-fetoproteína sérica usando pretratamiento con polietilenglicol.

Sin embargo, los presentes inventores han encontrado muestras en las que no se pudo inhibir adecuadamente la aparición de reacciones no específicas ni siquiera mediante los métodos mencionados anteriormente.

50

Bibliografía de la técnica anterior

Bibliografía de patentes

55 [Documento de patente 1] Solicitud examinada publicada japonesa n.º 1995-31207

[Documento de patente 2] Solicitud no examinada publicada japonesa n.º 2005-121441

[Documento de patente 3] Publicación de patente japonesa n.º 4083855

60

[Documento de patente 4] Solicitud no examinada publicada japonesa n.º 2006-308576

[Documento de patente 5] Solicitud no examinada publicada japonesa n.º 1995-12818

65 Bibliografía no de patentes

[Documento no de patente 1] New serum indicator of interstitial pneumonitis activity. Sialylated carbohydrate antigen KL-6. Kohno N, Kyoizumi S, Awaya Y, Fukuhara H, Yamakido M, Akiyama M. Chest. julio de 1989; 96 (1): 68-73.

5 [Documento no de patente 2] Interference by rheumatoid factor with the detection of C-reactive protein by the latex agglutination method. Deyo RA, Pope RM, Persellin RH. J Rheumatol. mayo-junio de 1980; 7 (3): 279-87.

[Documento no de patente 3] Latex agglutination assay for human anti-Brucella IgM antibodies; Cambiaso C. L. *et al.*, Journal of Immunological Methods, septiembre de 1989; 122 (2): 169-175

10 [Documento no de patente 4] Turbidimetric latex immunoassay for serum ferritin. Bernard A. *et al.*, Journal of Immunological Methods, julio de 1984; 71 (2): 141-147

[Documento no de patente 5] Latex immunoassay of serum alpha-fetoprotein using polyethylene glycol pretreatment. Passelecq B. *et al.*, abril de 1988; 109 (1): 69-74

15

Sumario de la invención

Problemas que van a resolverse mediante la invención

20 La presente invención tiene como objetivo proporcionar un reactivo de ensayo y un ensayo para medir con precisión KL-6, en particular, un reactivo de ensayo y un ensayo para medir con precisión KL-6 en muestras que contienen el factor reumatoide y/u otras sustancias no específicas.

Medios para resolver el problema

25

La presente invención proporciona un reactivo de inmunoensayo de KL-6 que comprende una disolución a de un pH de 4,0 a un pH de 5,5 que contiene una inmunoglobulina derivada de animal que reacciona con factor reumatoide y una disolución que contiene un portador insoluble en el que se inmoviliza un anticuerpo anti-KL-6.

30 La presente invención también proporciona un método para inmunoensayo de KL-6 que comprende usar una muestra, una inmunoglobulina derivada de animal que reacciona con factor reumatoide, y un portador insoluble en el que se inmoviliza un anticuerpo anti-KL-6 y medir el cambio en la absorbancia que acompaña a la aglutinación del portador insoluble debido a la reacción inmunitaria entre KL-6 en la muestra y el anticuerpo anti-KL-6 inmovilizado en el portador insoluble en una disolución a de un pH de 4,0 a un pH de 5,5.

35

Estudios extensos de los presentes inventores indicaron que pueden medirse con precisión KL-6 en muestras que contienen el factor reumatoide y/u otras sustancias no específicas usando un reactivo de inmunoensayo que comprende una disolución a pH de 4,0 a 5,5 que contiene el inhibidor de interferencia del factor reumatoide y un portador insoluble en el que se inmovilizan anticuerpos anti-KL-6. Esto condujo a completar la presente invención.

40

(1) Un reactivo de inmunoensayo de KL-6 que comprende una disolución (pH de 4,0 a 5,5) que contiene un inhibidor de interferencia del factor reumatoide y una disolución que contiene un portador insoluble en el que se inmoviliza un anticuerpo anti-KL-6.

45

(2) El reactivo de inmunoensayo según el punto (1) anterior, en el que el portador insoluble es una partícula de látex.

(3) Un inmunoensayo de KL-6 que comprende medir el cambio en la absorbancia que acompaña a la aglutinación de un portador insoluble debido a la reacción inmunitaria entre KL-6 en una muestra y un anticuerpo anti-KL-6 inmovilizado en el portador insoluble en una disolución a pH de 4,0 a 5,5, usando la muestra, un inhibidor de interferencia del factor reumatoide, y un portador insoluble en el que se inmoviliza un anticuerpo anti-KL-6.

50

(4) Un inmunoensayo de KL-6 en el que se añade una disolución a pH de 4,0 a 5,5 que contiene un inhibidor de interferencia del factor reumatoide y un portador insoluble en el que se inmoviliza un anticuerpo anti-KL-6 a una muestra y se mide el cambio en la absorbancia que acompaña a la aglutinación del portador insoluble debido a la reacción inmunitaria entre KL-6 en la muestra y el anticuerpo anti-KL-6 inmovilizado en el portador insoluble.

55

(5) El inmunoensayo según el punto (3) o (4) anterior, en el que el portador insoluble es una partícula de látex.

60 No existen restricciones particulares en cuanto al inhibidor de interferencia del factor reumatoide usado en la presente invención siempre que inhiba la interferencia del factor reumatoide en el inmunoensayo, y pueden mencionarse como ejemplos HBR (Scantibodies Lab) e inmunoglobulinas derivadas de animal que reaccionan con factor reumatoide tales como IgM, IgG e IgA.

65 Tal como se describió anteriormente, las inmunoglobulinas derivadas de animal pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales.

La cantidad usada del inhibidor de interferencia del factor reumatoide mencionado anteriormente es preferiblemente de 10 a 200 µg/ml.

5 Pueden mencionarse disoluciones tampón a pH de 4,0 a 5,5, tales como ácido cítrico, ácido acético, glicina y tampones de Good a las que se añade el inhibidor de interferencia del factor reumatoide, como disolución a pH de 4,0 a 5,5 que contiene el inhibidor de interferencia del factor reumatoide usada en la presente invención, y la concentración de la disolución tampón mencionada anteriormente es preferiblemente de 5 a 200 mM.

10 Tal como se describe en el documento de patente 1, el anticuerpo anti-KL-6 usado en la presente invención puede prepararse según el método convencional de producción de anticuerpos monoclonales tras inmunizar ratones con la línea celular derivada de adenocarcinoma pulmonar VMRC-LCR como antígeno (Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. Kohler G, Milstein C. Eur J Immunol. julio de 1976; 6 (7): 511-9).

15 Pueden mencionarse polvos de polímero orgánico, polvos inorgánicos, microorganismos, hematocitos y residuo celular como ejemplos del portador insoluble usado en la presente invención.

20 Pueden mencionarse polvos de polímero natural tales como agarosa insoluble, celulosa y dextrano insoluble y polvos de polímero sintético tales como poliestireno, copolímeros de estireno-sulfonato de estireno, copolímeros de acrilonitrilo-butadieno-estireno, copolímeros de cloruro de vinilo-éster de acrilato y copolímeros de acetato de vinilo-éster acrílico como ejemplos de los polvos de polímero orgánico mencionados anteriormente, en particular, resulta deseable látex en el que se ha suspendido uniformemente un polvo de polímero sintético.

25 Pueden mencionarse fragmentos metálicos tales como oro, titanio, hierro y níquel; sílice; alúmina y carbono en polvo como ejemplos de los polvos inorgánicos mencionados anteriormente.

Aunque el diámetro de partícula promedio del portador insoluble mencionado anteriormente depende del ensayo y dispositivo de medición, normalmente se usan partículas con un diámetro de desde 0,05 hasta 1,0 µm.

30 Puede mencionarse una unión química o física como ejemplo de métodos de inmovilización de anticuerpos anti-KL-6 en el portador insoluble mencionado anteriormente.

35 El portador insoluble mencionado anteriormente en el que se inmovilizan anticuerpos anti-KL-6 está presente normalmente en una disolución, y pueden mencionarse Tris, glicina y tampones de Good como ejemplos de las disoluciones usadas.

40 Pueden mencionarse líquidos corporales derivados fisiológicamente (biológicos) como los "analitos" que son las dianas principales de medición en el ensayo de la presente invención. Pueden mencionarse específicamente sangre, suero, plasma, orina, saliva, esputo, lágrimas, otorrea o líquido prostático, pero las muestras pueden no limitarse a estas.

45 Reacciones de hemaglutinación y aglutinación de látex son ejemplos de sistemas de medición usados para la medición de reacciones de anticuerpo-antígeno usando el reactivo mencionado anteriormente. Pueden emplearse métodos mediante los cuales se examina ópticamente el grado de aglutinación como método de medición de aglutinación provocada por las reacciones mencionadas anteriormente.

50 En particular, en el método de examen óptico, se miden la intensidad de luz dispersada, la absorbancia o la intensidad de luz transmitida que acompañan a la aglutinación del portador insoluble provocada por una inmunorreacción entre KL-6 en la muestra y anticuerpos anti-KL-6 inmovilizados en el portador insoluble, tras mezclar la disolución a pH de 4,0 a 5,5, que contiene el inhibidor de interferencia del factor reumatoide mencionado anteriormente, y la muestra con la disolución del portador insoluble mencionado anteriormente en el que se inmovilizan anticuerpos anti-KL-6. En este caso el pH de la mezcla mencionada anteriormente está preferiblemente en el intervalo de 4,0 a 5,5. Puede usarse una longitud de onda de medición de 300 a 1000 nm, y el ensayo mide el aumento o la disminución en la intensidad de luz dispersada, la absorbancia o la intensidad de luz transmitida según el diámetro de partícula, la concentración y el tiempo de reacción del portador insoluble usado, basándose en el conocimiento de un experto en la técnica.

60 Con el fin de realizar un inmunoensayo de la presente invención, la inmunorreacción entre KL-6 en la muestra y anticuerpos anti-KL-6 inmovilizados en el portador insoluble debe realizarse en condiciones en las que la muestra, el inhibidor de interferencia del factor reumatoide y el portador insoluble en el que se inmovilizan anticuerpos anti-KL-6 están presentes en una disolución a pH de 4,0 a 5,5.

65 Preferiblemente, pueden mencionarse ácido cítrico, ácido acético, glicina y tampón de Good de 5 a 200 mM, como ejemplos de la disolución mencionada anteriormente a pH de 4,0 a 5,5.

Efecto de la invención

Según la presente invención, en un inmunoensayo que usa una reacción de aglutinación de un portador insoluble tal como el ensayo de inmunoaglutinación de látex, pueden someterse a prueba numerosas muestras de manera rápida, fácil, económica y con precisión, incluso cuando existen preocupaciones acerca de la aparición o el aumento de reacciones no específicas atribuibles al factor reumatoide o anticuerpos heterófilos, reacciones no específicas en las que no se inhibe la interferencia por anticuerpos que se unen al factor reumatoide o diversos anticuerpos derivados de animal, reacciones no específicas atribuibles a algo distinto del factor reumatoide o anticuerpos heterófilos, reacciones no específicas debidas al uso de preparaciones de anticuerpos, etc.

Descripción de realizaciones

Materiales y métodos

<Anticuerpo anti-KL-6>

Se usó el anticuerpo obtenido mediante el método descrito en el documento de patente 1 (particularmente en el primer ejemplo) como anticuerpo anti-KL-6. El método de producción de anticuerpos descrito en el documento de patente 1 es tal como sigue:

1) Inmunización

Se inmunizaron por vía subcutánea ratones BALB/c hembra de ocho semanas de edad con 5×10^6 células derivadas a partir de una línea celular de adenocarcinoma pulmonar (a continuación en el presente documento VMRC-LCR), y posteriormente, se les inyectaron por vía intraperitoneal a los ratones 8×10^6 células dos veces con un intervalo de 2 semanas.

2) Fusión celular

Tres días tras la inmunización final, se extirpó el bazo y se hizo pasar a través de una malla inoxidable para preparar una suspensión celular. Se mezclaron células de bazo ($8,4 \times 10^7$) con células de mieloma resistentes a 8-azaguanina P3-NSI-Ag4/1 (NSI) ($4,2 \times 10^7$) y se centrifugaron. A continuación, se añadió 1 ml de polietilenglicol al 45% (peso molecular promedio de 6000) al precipitado, y se agitó suavemente la mezcla durante 2 min. Tras lavar, se suspendió la mezcla en medio RPMI que contenía suero de ternero fetal al 10% (medio RPMI completo), y se añadieron 10^6 células a 0,1 ml por pocillo a una placa de microcultivo de 96 pocillos. Tras 24 h, se añadieron 0,1 ml de medio RPMI completo que contenía 100 μ M de hipoxantina, 0,4 μ M de aminopterina y 16 μ M de timidina (medio HAT). En el segundo, tercer, quinto, séptimo y décimo día tras el comienzo del cultivo, se desecharon 0,1 ml de sobrenadante de cultivo y se añadió un volumen igual (0,1 ml) de medio HAT. Se observó proliferación de hibridomas en todos los pocillos tras 12 días.

3) Selección de hibridomas

Se seleccionaron hibridomas que producían anticuerpos frente a células VMRC-LCR mediante un inmunoensayo enzimático. El inmunoensayo enzimático se realizó tal como sigue:

Se cultivaron células VMRC-LCR en una placa de microcultivo de 96 pocillos hasta confluencia, se fijaron durante de 5 a 7 min en glutaraldehído al 0,25%, y se lavaron cinco veces. A continuación, se añadieron 0,1 ml de sobrenadante de cultivo de hibridoma, y se permitió que reaccionase la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente. Tras lavar cinco veces, se añadieron 50 μ l del anticuerpo de cabra conjugado con peroxidasa del rábano anti-inmunoglobulina de ratón como anticuerpo secundario y se permitió que reaccionase durante 1 h. Tras lavar de seis a siete veces, se añadieron 100 μ l de tampón ácido cítrico 50 mM que contenía disolución de peróxido de hidrógeno al 1,1% y 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) 150 μ g/ml, y se permitió que la mezcla desarrollase color durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 50 μ l de ácido oxálico al 10% para detener la reacción. Se midió la absorbancia a 405 nm mediante un espectrofotómetro de microplacas, y se seleccionaron hibridomas con absorbancia de 0,02 o más.

Se transfirieron los hibridomas seleccionados a una placa de cultivo de 24 pocillos en la que se habían unido timocitos de ratón BALB/c (células alimentadoras), y se cultivaron con medio RPMI completo que contenía hipoxantina 100 μ M y timidina 16 μ M (medio HT). Tras alcanzar la confluencia, se seleccionaron de nuevo hibridomas que producían anticuerpos frente a células VMRC-LCR mediante un inmunoensayo enzimático.

A continuación se clonaron los hibridomas seleccionados mediante el método de dilución limitante. En resumen, se diluyeron células hasta 50 ó 10 células/ml, se añadieron a una placa de microcultivo de 96 pocillos que contenía células alimentadoras a 0,1 ml por pocillo, y se cultivaron durante 2 semanas con medio HT. Se seleccionaron clones de los pocillos con una sola colonia de hibridomas. Se hicieron reaccionar estos clones con células

VMRC-LCR mediante un inmunoensayo enzimático, y se seleccionaron clones de hibridomas que secretaban anticuerpos que no mostraron ninguna reacción frente a fibroblastos pulmonares humanos normales.

Se seleccionaron clones que reaccionaban con fibroblastos pulmonares humanos de entre estos clones mediante tinción con inmunoperoxidasa de secciones congeladas. Específicamente, se obtuvieron carcinomas pulmonares humanos y carcinomas de otros órganos así como tejido normal mediante procedimientos quirúrgicos y se prepararon secciones congeladas de 4 µm. Tras la fijación con acetona, se añadió el sobrenadante de cultivo de clones de hibridomas, y se permitió que reaccionase la mezcla durante 30 min a temperatura ambiente. Tras lavar rigurosamente, se permitió que reaccionase la mezcla con el anticuerpo biotinilado anti-IgG de ratón (reaccionando con la cadena γ, la cadena λ y la cadena κ) durante 30 min a temperatura ambiente. Tras lavar adicionalmente, se añadió peroxidasa del rábano con avidina-biotina, y se permitió que reaccionase la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente. Tras lavar rigurosamente, se añadió tampón Tris-HCl 50 mM que contenía diaminobencidina 0,5 mg/ml (como sustrato) y peróxido de hidrógeno al 0,01% (pH 7,0), y se permitió que la mezcla desarrollase color.

De esta manera, se obtuvo un hibridoma que producía anticuerpos monoclonales que reaccionaban con epitelio alveolar; epitelio bronquiolar; células serosas de glándula bronquial; células foliculares de tiroides; epitelio de esófago; células de glándula cardiaca; epitelio de conducto pancreático; epitelio tubular; epitelio de transición de vejiga urinaria; endometrio; adenocarcinoma pulmonar; carcinoma de células escamosas pulmonar; carcinoma pulmonar de células pequeñas; adenocarcinoma de estómago, papila duodenal, conductos biliares, páncreas, colon, recto, tiroides y glándula mamaria; y carcinoma de células escamosas de esófago, pero no con epitelio bronquial; células mucosas gástricas superficiales; glándula pilórica; epitelio duodenal; epitelio del colon; epitelio del recto; hepatocitos; células exocrinas de páncreas; células endocrinas de páncreas; células glomerulares renales; célula escamosa de cuello uterino; epitelio dérmico; carcinoma de células escamosas de cuello uterino; y carcinoma hepatocelular. Este hibridoma se denominó una célula KL-6 y el anticuerpo monoclonal que produjo se denominó anticuerpo anti-KL-6.

4) Producción de anticuerpos monoclonales

Trasplante *in vivo*

Se les inyectaron por vía intraperitoneal, a ratones BALB/c a los que se les iba a trasplantar el hibridoma, 0,5 ml de 2,6,10,14-tetrametilpentadecano por anticipado (de 5 a 10 días antes), y se trasplantaron por vía intraperitoneal 5×10^6 células de hibridoma. Tras 3 semanas, se formaron tumores de hibridoma intraperitoneales y se dilató el abdomen en el ratón sometido a trasplante.

Como resultado, se generó una alta concentración de anticuerpo monoclonal en el líquido ascítico y el suero sanguíneo, y se recogieron estos líquidos.

<Preparación de partículas de látex>

En resumen, se mezclaron 1100 g de agua destilada, 200 g de estireno, 0,2 g de estirenosulfonato de sodio y una disolución acuosa de 1,5 g de persulfato de potasio disuelto en 50 g de agua destilada, en un recipiente de reacción de vidrio de 2 l equipado con un agitador, un condensador de reflujo, un detector de temperatura, una entrada de nitrógeno y una camisa. Se reemplazó la atmósfera en el recipiente por gas nitrógeno, y se polimerizó la mezcla durante 48 h a 70°C con agitación.

Tras la polimerización, se filtró la disolución mencionada anteriormente a través de un papel de filtro y se recuperaron partículas de látex. Se midió el diámetro de las partículas de látex obtenidas mediante análisis de imágenes de al menos 100 partículas. Se tomaron fotografías para el análisis de imágenes de las partículas de látex a un aumento de 10.000x usando un microscopio electrónico de transmisión (JEM-1010, JEOL). El diámetro promedio fue de 0,2 µm.

Ejemplos

[EJEMPLO 1]

(Preparación de una disolución que contiene partícula de látex con anticuerpo anti-KL-6 inmovilizado (una disolución que contiene partículas de látex en las que se inmovilizan anticuerpos anti-KL-6; denominada reactivo 2 a continuación en el presente documento))

Se añadió una disolución de anticuerpo anti-KL-6 (Tris-HCl 5 mM, pH 8,0) ajustada hasta 0,7 mg/ml a una cantidad igual de disolución que contenía partículas de látex al 1,0% que tenían un diámetro de partícula promedio de 0,2 µm (Tris-HCl 5 mM, pH 8,0). Tras agitar durante 2 h a 4°C, se añadió una cantidad igual de disolución de BSA al 2,0% (Tris-HCl 5 mM, pH 8,0), y se agitó la mezcla durante 1 h a 4°C. Tras la centrifugación, se desechó el sobrenadante, y se resuspendió el precipitado en Tris-HCl 5 mM, pH 8,0. Se diluyó esta mezcla con Tris-HCl 5 mM, pH 8,0 de manera que la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm fue de 4,5 Abs. Se usó esta disolución como reactivo

2.

Preparación de una disolución que contiene el inhibidor de interferencia del factor reumatoide (a continuación en el presente documento, reactivo 1).

Específicamente, se preparó tampón citrato 30 mM (pH 4,0) que contenía cloruro de sodio 1000 mM, BSA al 1,0% y HBR 50 µg/ml (Scantibodies Lab, 3KC533) y se usó como reactivo 1.

(Muestra)

Se midió la concentración del factor reumatoide en muestras a partir de pacientes con reumatismo mediante el ensayo N-assay Nittobo TIA RF (Nittobo Medical Co., Ltd.) y se midió la concentración de KL-6 usando Picolumi (marca comercial registrada) KL-6 (Sanko Junyaku Co., Ltd.); se midió cada una según la documentación de producto e instrucciones del fabricante respectivas. Se expresó el valor de KL-6 medido como el 100% y se comparó con el valor medido según el inmunoensayo de la presente invención.

(Ensayo de la concentración de KL-6)

Se mezclaron el reactivo 1 y el reactivo 2, y se midió la concentración de KL-6 en la muestra que contenía el factor reumatoide usando un analizador automatizado Hitachi 7170. Específicamente, se añadieron 150 µl de reactivo 1 a 2,5 µl de muestra y tras incubar durante 5 min a 37°C, se añadieron 50 µl de reactivo 2, y se agitó la mezcla. Se midieron los cambios en la absorbancia asociados con la aglutinación a lo largo los siguientes 5 min a una longitud de onda principal de 570 nm y una longitud de onda secundaria de 800 nm. Se calculó la concentración de KL-6 aplicando el cambio en la absorbancia a una curva de calibración obtenida mediante la medición de una sustancia patrón de concentración conocida.

(Ensayo de pH de la mezcla)

Tras mezclar la muestra, el reactivo 1 y el reactivo 2 en la misma razón que en el ensayo de KL-6 mencionado anteriormente, se midió el pH usando un medidor de pH Castany LAB F-21 (Horiba Ltd.).

[EJEMPLOS 2 A 4]

En lugar de tampón citrato 30 mM (pH 4,0) en el reactivo 1 del ejemplo 1, se usaron tampones citrato 30 mM a pH 4,5 (ejemplo 2), pH 5,0 (ejemplo 3) y pH 5,5 (ejemplo 4). Se realizaron mediciones usando los mismos reactivos y el mismo ensayo que en el ejemplo 1.

(Ejemplos comparativos 1 a 6)

Se realizaron mediciones usando los mismos reactivos y el mismo ensayo que en el ejemplo 1 excepto porque se usaron tampón glicina 30 mM a pH 3,5 (ejemplo comparativo 1) y tampones fosfato 30 mM a pH 6,0 (ejemplo comparativo 2), 6,5 (ejemplo comparativo 3), 7,0 (ejemplo comparativo 4), 7,5 (ejemplo comparativo 5) y 8,0 (ejemplo comparativo 6) en lugar de tampón citrato 30 mM (pH 4,0) en el reactivo 1 del ejemplo 1.

Resultados y discusión

Se investigó la eficacia de la inhibición de reacciones no específicas cuando se varió el pH del reactivo 1 para una muestra que contenía una alta concentración del factor reumatoide (muestra con factor reumatoide elevado). En la tabla 1 se muestran los resultados de mediciones del reactivo 1 a pH de 3,5 a 8,0 para las muestras A y B con factor reumatoide elevado y la muestra C normal (ejemplos 1 a 4, ejemplos comparativos 1 a 6).

Tabla 1

Disolución de dilución de muestra			Ácido cítrico				Glicina	Ácido fosfórico				
pH			4,0	4,5	5,0	5,5	3,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
	Conc. de RF (U/ml)	Conc. de KL-6* (U/ml)	Ej. 1	Ej. 2	Ej. 3	Ej. 4	Ej. comp. 1	Ej. comp. 2	Ej. comp. 3	Ej. comp. 4	Ej. comp. 5	Ej. comp. 6
Muestra A	1019	553	109,7%	111,3%	111,6%	111,6%	120,4%	146,5%	143,0%	137,8%	135,9%	123,8%
Muestra B	894	2880	109,6%	112,8%	114,5%	112,1%	114,3%	113,0%	112,1%	114,1%	114,5%	114,9%
Muestra C	11	494	94,4%	91,0%	89,5%	93,0%	100,5%	91,6%	85,1%	86,0%	90,5%	93,3%

Glicina: Tampón glicina

Ácido cítrico: Tampón citrato

Ácido fosfórico: Tampón fosfato

5 RF: Factor reumatoide

*: Medición mediante Picolumi (marca comercial registrada) KL-6

10 El porcentaje en los ejemplos y los ejemplos comparativos es con respecto a un valor del 100% de las mediciones mediante Picolumi (marca comercial registrada) KL-6

Conc.: Concentración

Ej.: Ejemplo

15 Ej. comp.: Ejemplo comparativo

20 Considerando que la concentración de KL-6 medida mediante Picolumi (marca comercial registrada) KL-6 era del 100%, se creyó que se producían reacciones no específicas cuando los valores de KL-6 medidos mediante el ensayo de la presente invención eran de menos del 85% o de más del 115%. Si los valores estaban dentro del intervalo del 85% al 115%, se consideró que el método tenía precisión suficiente, y se confirmó la eficacia de la inhibición de reacciones no específicas.

25 Usando el inhibidor de interferencia del factor reumatoide y el intervalo de pH de la técnica anterior (pH de 6,0 a 8,0), los valores medidos para la muestra B con factor reumatoide elevado estaban dentro del intervalo del 85% al 115% de los valores medidos mediante Picolumi (marca comercial registrada) KL-6. Por otro lado, los valores medidos para la muestra A con alto factor reumatoide, superaron el 115% de los valores medidos mediante Picolumi (marca comercial registrada) KL-6 en el intervalo de pH de la técnica anterior (ejemplos comparativos 2 a 6), y se observó una reacción no específica, que no pudo inhibirse suficientemente ni siquiera por el inhibidor de interferencia del factor reumatoide.

30 Sorprendentemente, tras cambiar el pH del reactivo 1 al intervalo de desde 4,0 hasta 5,5, los valores medidos para las muestras tanto A como B con factor reumatoide elevado estaban dentro del intervalo del 85% al 115% de los valores medidos mediante Picolumi (marca comercial registrada) KL-6 y se inhibieron reacciones no específicas (ejemplos 1 a 4). Este resultado mostró que se inhibieron las reacciones no específicas del factor reumatoide y las distintas del factor reumatoide mediante la presente invención, y los valores medidos fueron precisos. Puesto que no se observó ninguna variación dependiente del pH o del tampón en los valores medidos para la muestra C, se confirmó que la variación del pH o el cambio de tampones no afectan a los valores medidos de KL-6.

40 En la tabla 2 se muestran los resultados de la medición de pH cuando se mezclaron la muestra, el reactivo 1 y el reactivo 2 en la misma razón que en el ensayo de concentración de KL-6 mencionado anteriormente.

Tabla 2

Disolución de dilución de muestra pH	Ácido cítrico				Glicina	Ácido fosfórico				
	4,0	4,5	5,0	5,5		6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
	<u>Ej. 1</u>	<u>Ej. 2</u>	<u>Ej. 3</u>	<u>Ej. 4</u>	Ej. comp. 1	Ej. comp. 2	Ej. comp. 3	Ej. comp. 4	Ej. comp. 5	Ej. comp. 6
Muestra A	4,0	4,5	5,0	5,5	3,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
Muestra B	4,0	4,5	5,0	5,5	3,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
Muestra C	4,0	4,5	5,0	5,5	3,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0

45 Glicina: Tampón glicina

Ácido cítrico: Tampón citrato

50 Ácido fosfórico: Tampón fosfato

Ej.: Ejemplo

Ej. comp.: Ejemplo comparativo

Tal como se describió anteriormente, el pH del reactivo 1 (pH de 4,0 a 5,5), para el que no se observaron reacciones no específicas, todavía era de 4,0 a 5,5 tras mezclar (ejemplos 1 a 4). Esto sugirió que podría obtenerse la misma eficacia de la inhibición de reacciones no específicas usando un pH de desde 4,0 hasta 5,5 cuando se mide la concentración de KL-6.

[EJEMPLOS 5 Y 6 Y EJEMPLOS COMPARATIVOS 7 A 10]

(Preparación del reactivo 1)

<Ejemplos 5 y 6>

Se prepararon tampón citrato 30 mM (ejemplo 5: pH 4,0, 4,5, 5,0 y 5,5) y tampón acetato 30 mM (ejemplo 6: pH 4,0, 4,5, 5,0 y 5,5) que contenían cloruro de sodio 1000 mM, BSA al 1,0% y HBR 50 µg/ml (Scantibodies Lab, 3KC533) como disoluciones que contenían el inhibidor de interferencia del factor reumatoide.

<Ejemplo comparativo 7>

En resumen, se prepararon tampón fosfato 30 mM (pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 y 8,0), tampón glicina 30 mM (pH 3,5) y tampón citrato 30 mM (pH 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 y 6,0) que contenían cloruro de sodio 1000 mM y BSA al 1,0% como disoluciones que no contenían el inhibidor de interferencia del factor reumatoide (sin HBR).

<Ejemplo comparativo 8>

Se prepararon tampón fosfato 30 mM (pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 y 8,0), tampón glicina 30 mM (pH 3,5) y tampón citrato 30 mM (pH 6,0) que contenían cloruro de sodio 1000 mM, BSA al 1,0% y HBR 50 µg/ml (Scantibodies Lab, 3KC533) como disoluciones que contenían el inhibidor de interferencia del factor reumatoide.

<Ejemplo comparativo 9>

Se prepararon tampón fosfato 30 mM (pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 y 8,0), tampón glicina 30 mM (pH 3,5) y tampón acetato 30 mM (pH 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 y 6,0) que contenían cloruro de sodio 1000 mM y BSA al 1,0% como disoluciones que no contenían el inhibidor de interferencia del factor reumatoide.

<Ejemplo comparativo 10>

Se prepararon tampón fosfato 30 mM (pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 y 8,0), tampón glicina 30 mM (pH 3,5) y tampón acetato 30 mM (pH 6,0) que contenían cloruro de sodio 1000 mM, BSA al 1,0% y HBR 50 µg/ml (Scantibodies Lab, 3KC533) como disoluciones que contenían el inhibidor de interferencia del factor reumatoide.

(Medición de muestras)

Se midieron concentraciones de KL-6 mediante el mismo ensayo que en el ejemplo 1, usando el tampón descrito anteriormente en los ejemplos 5 y 6 y los ejemplos comparativos 7 a 10 como el reactivo 1 respectivo y el reactivo 2 descrito en el ejemplo 1 como reactivo 2.

Resultados y discusión

Se investigó la eficacia de la inhibición de reacciones no específicas cuando difirió el pH de disoluciones que contenían o que no contenían el inhibidor de interferencia del factor reumatoide. En las tablas 3, 4 y 5 se muestran los resultados. Se dividieron las muestras en grupos a, b y c como en la tabla basándose en el comportamiento de cada muestra en diversas condiciones.

Tabla 3

Valor medido a cada pH en disoluciones que no contenían el inhibidor de interferencia del factor reumatoide (ejemplo comparativo 7)

		Conc. de RF (U/ml)	Conc. de KL-6* (U/ml)	Ácido cítrico				Glicina	Ácido cítrico	Ácido fosfórico				
				4,0	4,5	5,0	5,5			3,5	6,0	6,0	6,5	7,0
Grupo a	Mues- tra D	100	211	131,9%	116,5%	116,0%	115,3%	138,3%	133,9%	117,6%	133,8%	146,5%	142,8%	140,1%

ES 2 535 529 T3

	Mues- tra E	1755	953	141,8%	131,2%	157,5%	323,8%	707,8%	704,8%	875,3%	659,9%	499,6%	542,2%	605,4%
Grupo b	Mues- tra F	371	284	145,3%	116,5%	123,9%	127,2%	126,1%	271,1%	150,6%	273,0%	380,2%	267,6%	171,3%
	Mues- tra G	376	301	123,2%	199,5%	253,2%	326,8%	217,4%	461,8%	256,3%	375,4%	610,3%	693,6%	737,5%
	Mues- tra H	18	752	212,3%	153,9%	134,6%	134,5%	131,1%	137,9%	134,7%	137,5%	145,6%	134,9%	126,5%
Grupo c	Mues- tra I	8	1327	108,9%	99,5%	94,3%	96,1%	92,2%	92,0%	97,0%	97,8%	97,9%	98,3%	96,9%
	Mues- tra J	144	708	102,9%	102,9%	99,7%	105,2%	107,8%	105,9%	108,5%	109,4%	112,8%	110,7%	113,1%

Glicina: Tampón glicina

Ácido cítrico: Tampón citrato

Ácido fosfórico: Tampón fosfato

RF: Factor reumatoide

*: Medición mediante Picolumi (marca comercial registrada) KL-6

El porcentaje es con respecto a un valor del 100% de las mediciones mediante Picolumi (marca comercial registrada) KL-6

Cifras en el área sombreada de gris: Valores mayores del $\pm 15\%$ de Picolumi (marca comercial registrada) KL-6

4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 3,5, 6,0, 6,5, 7,0 y 8,0 bajo los nombres de los tampones representan el pH de las disoluciones de dilución de muestra

Conc.: Concentración

Tabla 4

Valor medido a cada pH en disoluciones que contenían el inhibidor de interferencia del factor reumatoide [ejemplo 5 (pH 4,0-5,5) y ejemplo comparativo 8 (pH 3,5, 6,0-8,0)]

		Conc. de RF (UI/ml)	Conc. de KL- 6* (U/ml)	Ácido cítrico				Glicina	Ácido cítrico	Ácido fosfórico				
				4,0	4,5	5,0	5,5	3,5	6,0	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
Grupo a	Mues- tra D	100	211	92,0%	108,8%	110,9%	110,3%	128,5%	123,8%	115,6%	125,2%	130,1%	131,6%	127,6%
	Mues- tra E	1755	953	105,2%	109,3%	109,7%	112,2%	140,5%	132,4%	123,2%	130,3%	160,5%	175,6%	180,7%
Grupo b	Mues- tra F	371	284	96,7%	98,0%	99,5%	103,1%	102,7%	104,6%	101,5%	96,9%	99,0%	97,4%	97,4%
	Mues- tra G	376	301	94,9%	100,5%	100,2%	97,5%	101,6%	101,4%	97,5%	94,6%	98,9%	97,2%	96,0%
	Mues- tra H	18	752	96,8%	97,0%	101,8%	103,9%	102,7%	101,3%	105,3%	100,4%	101,3%	101,1%	99,5%
Grupo c	Mues- tra I	8	1327	110,7%	98,9%	97,3%	96,2%	97,2%	92,3%	97,0%	98,9%	98,7%	98,3%	97,3%
	Mues- tra J	144	708	101,2%	103,7%	99,1%	99,5%	104,0%	98,0%	101,9%	103,7%	102,7%	101,4%	100,9%

Glicina: Tampón glicina

Ácido cítrico: Tampón citrato

Ácido fosfórico: Tampón fosfato

RF: Factor reumatoide

*: Medición mediante Picolumi (marca comercial registrada) KL-6

El porcentaje es con respecto a un valor del 100% de las mediciones mediante Picolumi (marca comercial registrada) KL-6

Cifras en el área sombreada de gris: Valores mayores del $\pm 15\%$ de Picolumi (marca comercial registrada) KL-6

4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 3,5, 6,0, 6,5, 7,0 y 8,0 bajo los nombres de los tampones representan el pH de las disoluciones de dilución de muestra

Conc.: Concentración

Tabla 5

Valores medidos a cada pH en disoluciones que no contenían y que contenían el inhibidor de interferencia del factor reumatoide

(1) Disoluciones que no contenían el inhibidor de interferencia del factor reumatoide (ejemplo comparativo 9)

		Conc. de RF (UI/ml)	Conc. de KL-6* (U/ml)	Ácido acético				Glicina	Ácido acético	Ácido fosfórico				
				4,0	4,5	5,0	5,5			6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
Grupo a	Muestra D	100	211	122,1%	116,1%	119,3%	128,2%	138,3%	148,1%	117,6%	133,8%	146,5%	142,8%	140,1%
	Muestra E	1755	953	149,1%	152,0%	179,1%	911,5%	707,8%	631,0%	875,3%	659,9%	499,6%	542,2%	605,4%
Grupo b	Muestra F	371	284	127,4%	117,5%	124,2%	150,3%	126,1%	325,7%	150,6%	273,0%	380,2%	267,6%	171,3%
	Muestra G	376	301	163,9%	207,8%	291,8%	412,7%	217,4%	468,8%	256,3%	375,4%	610,3%	693,6%	737,5%
	Muestra H	18	752	168,8%	139,5%	134,2%	135,4%	131,1%	142,7%	134,7%	137,5%	145,6%	134,9%	126,5%
Grupo c	Muestra I	8	1327	94,7%	91,2%	91,4%	91,2%	92,2%	93,7%	97,0%	97,8%	97,9%	98,3%	96,9%
	Muestra J	144	708	96,0%	98,8%	98,8%	103,8%	107,8%	108,8%	108,5%	109,4%	112,8%	110,7%	113,1%

Tabla 5 (cont.)

(2) Disoluciones que contenían el inhibidor de interferencia del factor reumatoide [ejemplo 6 (pH 4,0-5,5) y ejemplo comparativo 10 (pH 3,5 y 6,0-8,0)]

		Conc. de RF (UI/ml)	Conc. de KL-6* (U/ml)	Ácido acético				Glicina	Ácido acético	Ácido fosfórico				
				4,0	4,5	5,0	5,5			6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
Grupo a	Muestra D	100	211	104,9%	105,7%	102,6%	113,0%	128,5%	126,4%	115,6%	125,2%	130,1%	131,6%	127,6%
	Muestra E	1755	953	111,9%	104,7%	112,3%	114,9%	140,5%	142,4%	123,2%	130,3%	160,5%	175,6%	180,7%
Grupo b	Muestra F	371	284	91,2%	98,2%	102,1%	101,0%	102,7%	98,5%	101,5%	96,9%	99,0%	97,4%	97,4%
	Muestra G	376	301	105,1%	97,2%	104,9%	105,8%	101,6%	102,8%	97,5%	94,6%	98,9%	97,2%	96,0%
	Muestra H	18	752	86,7%	96,3%	97,6%	101,8%	102,7%	99,9%	105,3%	100,4%	101,3%	101,1%	99,5%
Grupo c	Muestra I	8	1327	92,3%	91,7%	90,2%	92,7%	97,2%	94,0%	97,0%	98,9%	98,7%	98,3%	97,3%
	Muestra J	144	708	93,8%	94,2%	95,7%	96,9%	104,0%	101,3%	101,9%	103,7%	102,7%	101,4%	100,9%

Glicina: Tampón glicina

Ácido fosfórico: Tampón fosfato

Ácido acético: Tampón acetato

RF: Factor reumatoide

*: Medición mediante Picolumi (marca comercial registrada) KL-6

El porcentaje es con respecto a un valor del 100% de las mediciones mediante Picolumi (marca comercial registrada) KL-6

Cifras en el área sombreada de gris: Valores mayores del $\pm 15\%$ de Picolumi (marca comercial registrada) KL-6

4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 3,5, 6,0, 6,5, 7,0 y 8,0 bajo los nombres de los tampones representan el pH de las disoluciones de dilución de muestra

Conc.: Concentración

Se obtuvieron excelentes resultados del $\pm 15\%$ de los valores medidos mediante Picolumi (marca comercial registrada) KL-6 del grupo c en las tablas 3 y 4 a cada pH, independientemente de la presencia del inhibidor de interferencia del factor reumatoide lo que sugirió que el propio inhibidor de interferencia del factor reumatoide no tenía ningún efecto adverso sobre los valores medidos.

Por otro lado, se confirmó la existencia de muestras que superaban el 115% de los valores medidos mediante Picolumi (marca comercial registrada) KL-6 y para las que se producían reacciones no específicas cuando se midieron usando disoluciones que no contenían el inhibidor de interferencia del factor reumatoide, tales como las muestras incluidas en los grupos a y b en la tabla 3.

Se obtuvieron excelentes resultados para las muestras del grupo b en la tabla 4 cuando se añadió el inhibidor de interferencia del factor reumatoide, independientemente del pH, y se confirmó que el inhibidor de interferencia del factor reumatoide inhibía reacciones no específicas. Por otro lado, a pH 3,5 y entre pH 6,0 y 8,0, no se observó ningún efecto de inhibición de reacciones no específicas para las muestras del grupo a en la tabla 4, ni siquiera cuando se añadió el inhibidor de interferencia del factor reumatoide; sin embargo, entre pH 4,0 y 5,5, se observó un fuerte efecto de inhibición de reacciones no específicas.

Incluso cuando se cambió el tampón de ácido cítrico (ácido tricarbóxico) a ácido acético (ácido monocarbóxico) que tenía pH de 4,0 a 6,0, aunque hubieron muestras que superaban el 115% de los valores medidos mediante Picolumi (marca comercial registrada) KL-6 y para las que se producían reacciones no específicas con disoluciones que no contenían el inhibidor de interferencia del factor reumatoide [tabla 5 (1)], se observó el mismo efecto de inhibición de reacciones no específicas que en el caso de tampón citrato con disoluciones que sí incluían el inhibidor de interferencia del factor reumatoide entre pH 4,0 y 5,5 [tabla 5 (2)]. Por otro lado, en el grupo a en las tablas 3 a 5, no se observó ningún efecto de inhibición de reacciones no específicas a pH 6,0 usando cualquiera de tampón citrato o acetato, lo que sugirió que el uso del inhibidor de interferencia del factor reumatoide, y el ajuste del pH de la disolución diluida de muestra a entre 4,0 y 5,5 cuando se mide KL-6, inhiben reacciones no específicas lo más eficazmente, independientemente del tipo de tampón.

Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona un método para medir KL-6 para ayudar en el diagnóstico y la determinación de estrategias terapéuticas para neumonía intersticial y un reactivo de ensayo o kit de reactivos para la implementación del método mencionado anteriormente. La presente invención es útil para el diagnóstico y la determinación de estrategias terapéuticas para neumonía intersticial incluyendo neumonía intersticial inducida por fármacos y neumonía intersticial que se origina por trastorno del colágeno, el diagnóstico de pacientes con cánceres tales como cáncer de pulmón y cáncer de páncreas, y para fines tales como diagnóstico y determinación de estrategias terapéuticas para neumonía intersticial en pacientes tratados con una preparación de anticuerpos para artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, artritis idiopática juvenil generalizada y enfermedad de Castleman. Puesto que la presente invención está protegida según sea necesario como reactivo, kit de reactivos y uso de estos en la fabricación, tiene aplicabilidad industrial y no está excluida de la patentabilidad.

REIVINDICACIONES

1. Reactivo de inmunoensayo de KL-6 que comprende una disolución a de un pH de 4,0 a un pH de 5,5 que contiene una inmunoglobulina derivada de animal que reacciona con factor reumatoide y una disolución que contiene un portador insoluble en el que se inmoviliza un anticuerpo anti-KL-6.
5
2. Reactivo de inmunoensayo según la reivindicación 1, en el que el portador insoluble es una partícula de látex.
3. Reactivo de inmunoensayo según la reivindicación 1 ó 2, en el que la inmunoglobulina derivada de animal que reacciona con factor reumatoide es una IgM, IgG o IgA.
10
4. Método para inmunoensayo de KL-6 que comprende usar una muestra, una inmunoglobulina derivada de animal que reacciona con factor reumatoide, y un portador insoluble en el que se inmoviliza un anticuerpo anti-KL-6 y medir el cambio en la absorbancia que acompaña a la aglutinación del portador insoluble debido a la reacción inmunitaria entre KL-6 en la muestra y el anticuerpo anti-KL-6 inmovilizado en el portador insoluble en una disolución a de un pH de 4,0 a un pH de 5,5.
15
5. Método para inmunoensayo de KL-6 según la reivindicación 4, en el que la etapa de usar una muestra, inmunoglobulinas derivadas de animal que reaccionan con factor reumatoide y un portador insoluble en el que se inmoviliza un anticuerpo anti-KL-6 comprende añadir a la muestra una disolución a de un pH de 4,0 a un pH de 5,5 que contiene las inmunoglobulinas derivadas de animal que reaccionan con factor reumatoide y una disolución del portador insoluble en el que se inmoviliza un anticuerpo anti-KL-6.
20
6. Método para el inmunoensayo de KL-6 según la reivindicación 4 ó 5, en el que el portador insoluble es una partícula de látex.
25
7. Método para el inmunoensayo de KL-6 según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que la inmunoglobulina derivada de animal que reacciona con factor reumatoide es IgM, IgG o IgA.