



MD/EP 3365367 T2 2024.02.29

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3365367 (13) T2

(51) Int. Cl: C07K 16/18 (2006.01.01)
G01N 33/577 (2006.01.01)
C12N 5/12 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2018 0844 (22) Data de depozit: 2016.10.21 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 16858386.2, 2016.10.21 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3365367, 2018.08.29 (31) Numărul cererii prioritare: 201562244189 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2015.10.21 (33) Țara cererii prioritare: US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 02/2024, 2024.02.29 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 23/2023, 2023.06.07 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 10/2018, 2018.10.31
(71) Solicitant: REDCOAT SOLUTIONS, INC., US (72) Inventatori: HALL William John, US; WANG Min, US (73) Titular: REDCOAT SOLUTIONS, INC., US (74) Mandatar autorizat: CORCODEL Angela	

(54) Anticorpi monoclonali împotriva ploșnițelor de pat și procedee de obținere și utilizare a acestora

(57) Rezumat:

1

Prezenta dezvăluire furnizează anticorpi monoclonali anti-insecte de pat și fragmente ale acestora de legare la antigen, precum și compoziții și truse care îi cuprind. Prezenta dezvăluire oferă, de asemenea, metode de producere a anticorpilor monoclonali și a fragmentelor acestora de legare la antigen și metode de utilizare a acestora pentru a detecta ploșnițele de pat.

Revendicări: 16

Figuri: 20

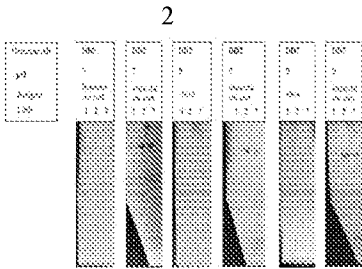


FIG. 1

MD/EP 3365367 T2 2024.02.29

(54) Anti-bed bug monoclonal antibodies and methods of making and uses thereof

(57) Abstract:

1
The present disclosure provides anti-bed bug monoclonal antibodies and antigen-binding fragments thereof as well as compositions and kits comprising the same. The present disclosure also provides methods of making monoclonal antibodies and antigen-

2
binding fragments thereof and methods of using the same to detect bed bugs.

Claims: 16

Fig.: 20

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****DOMENIU**

- 5 Prezenta dezvoltare se referă la anticorpi monoclonali anti-insecte de pat, compoziții cuprinzând astfel de anticorpi și procedee de producere și utilizare a acestor anticorpi.

FONDUL INVENȚIEI

- 10 Amploarea și numărul infestațiilor cu insecte de pat în Statele Unite au crescut de peste un deceniu. Insectele de pat se găsesc în mod obișnuit în locuințe cu mai multe unități, cum ar fi apartamente, cămine, case de bătrâni și hoteluri, precum și în locuri publice precum teatre, transport public și centre comerciale.

- Deși insectele de pat nu sunt vectori cunoscuți ai niciunui agent patogen, există unele dovezi că insectele de pat ar putea acționa ca vectori mecanici ai virusului hepatitei B (Blow și colab., J. Med. Entomol. 38: 694-700 (2001)). Rezistența la metilicilină a *Staphylococcus aureus* (MRSA) și rezistența la vancomicină *Enterococcus faecium* au fost recuperate de la insectele de pat asociate cu o persoană fără adăpost (Lowe și colab., Emerg. Infect. Dis. 17: 1132-1134 (2011)).

Strategiile de detectare utilizate în prezent includ:

- 20 - Detectare vizuală: Verificarea personală a saltelelor și a cearșafurilor de pat, a tapițeriei și a covoarelor pentru ploșnițe, exoschelete sau picături fecale necesită timp și este adesea complicată de adăposturi criptice, inaccesibile;

- Detectare canină: Rezultatele la câinii care adulmecă ploșnițe sunt foarte variabile. Succesul depinde de câine și dresor și de tipul de antrenare și recompensă. Detectarea canină produce un număr inacceptabil de mare de fals pozitiv, iar vizibilitatea sa duce la relații publice neplăcute;

- 25 - Monitoare active sau pasive. Monitoare active - cum ar fi Verifi® de la FMC, CDC3000® de la Stern Environmental sau NightWatch® de la BioSensory, Inc. - se bazează pe amestecuri personalizate de feromoni sau dioxid de carbon, pentru a atrage ploșnițele de pat într-o capcană. Monitoare pasive, cum ar fi ClimbUp® Insect Interceptor, sunt plasate lângă o persoană adormită și folosesc căldura și dioxidul de carbon ale acelei persoane pentru a atrage și a prinde ploșnițele de pat. Eficacitatea monitoarelor active și pasive depinde de densitatea populației de ploșnițe și poate rata sau subestima introducerile mici de insecte. Majoritatea monitoarelor au, de asemenea, o amprentă inacceptabil de mare, necesită personal special instruit și costă prea mult. În plus, ambele strategii implică de fapt gestionarea ploșnițelor moarte, pe care majoritatea oamenilor le consideră neplăcute;

Alte abordări ale detectării ploșnițelor includ:

- 35 - Reacția în lanț a multiplex polimerazei (PCR) pentru a distinge ouăle de ploșnițe sau fragmentele de insecte din locuințele umane. Această tehnică depinde de recuperarea fizică a ouălor sau a fragmentelor de insecte și de procesarea lor folosind reactivi și tehnici standard de biologie moleculară (Szalanski și colab., J. Med. Entomol. 48: 937-940 (2011));

- 40 - Microextracția probelor de aer pentru a identifica doi feromoni volatili bine caracterizați, (E)-2-hexenal și (E)-2-octenal, prin cromatografie în gaz și spectrometrie de masă (Eom și colab., Anal Chim Acta 716: 2-10 (2012));

- Utilizarea senzorilor de infraroșu, microfoanelor și a unui senzor piezoelectric pentru a detecta locomoția (Mankin și colab., J. Econ. Entomol. 103: 1636-1646 (2010));

- Detectarea nitroforinei, un antigen salivar specific ploșniței de pat (brevet U.S. Nr. 7.743.552);

- Detectarea antigenelor din sângele uman în excrețiile de ploșnițe (brevet U.S. Nr. 8.460.890); și

- 45 - Detectarea antigenelor ploșnițelor de pat de către anticorpi policlonali (publicația U.S. Nr. 2015/0064727).

- Numărul de opțiuni de detectare disponibile este limitat și este nevoie de o metodă de detectare convenabilă, ușor de utilizat, care detectează rapid, reproductibil, eficient și direct ploșnițele de pat. Spre deosebire de abordările anterioare, prezenta invenție furnizează anticorpi monoclonali care satisfac
- 50 nevoia.

REZUMAT

- 55 Prezenta invenție se referă la un anticorp monoclonal anti-insectă de pat produs de hibridomul depus la American Type Culture Collection (ATCC) cu numărul de acces PTA-122644 [BB2], sau un fragment al acestuia de legare la antigen.

Prezenta invenție se referă la un anticorp monoclonal anti-insectă de pat produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de Acces PTA-122645 [BB7] sau un fragment al acestuia de legare la antigen.

Prezenta invenție se referă la un anticorp monoclonal conjugat sau un fragment conjugat de legare la antigen care cuprinde oricare dintre anticorpii monoclonali anti-insecte de pat sau fragmentele de legare la antigen ale invențiilor de mai sus și un agent de detectare. În anumite variante de realizare, agentul de detectare este o etichetă enzimatică, o marcă radioactivă, un fluorofor, un cromofor, un agent de imagistică, un metal, un ion metalic, aur coloidal sau nanoparticule de aur. În anumite variante de realizare, anticorpul monoclonal conjugat sau fragmentul de legare la antigen conjugat cuprinde un anticorp monoclonal anti-insectă de pat produs de hibridomul depus la ATCC sub Numărul de acces PTA-122644 [BB2] sau un fragment de legare la antigen al acestuia. În anumite variante de realizare, anticorpul monoclonal conjugat sau fragmentul de legare la antigen conjugat cuprinde un anticorp monoclonal anti-insectă de pat produs de hibridomul depus la ATCC sub Numărul de acces PTA-122645 [BB7] sau un fragment de legare la antigen al acestuia.

Prezenta invenție se referă la o compoziție care cuprinde oricare dintre anticorpii monoclonali anti-insecte de pat sau fragmente de legare la antigen, sau anticorpi conjugați sau fragmente conjugate de legare la antigen ale invențiilor sau realizărilor de mai sus, sau o combinație a acestora. În anumite variante de realizare, compoziția cuprinde un anticorp monoclonal anti-ploșniță de pat produs de hibridomul depus la ATCC sub Număr de acces PTA-122644 [BB2] și un anticorp monoclonal anti-ploșniță de pat produs de hibridomul depus la ATCC sub Număr de acces PTA-122645 [BB7]. În anumite variante de realizare, compoziția cuprinde un anticorp monoclonal anti-ploșniță de pat produs de hibridomul depus la ATCC sub Numărul de Acces PTA-122644 [BB2] și un anticorp conjugat care cuprinde anticorpul monoclonal anti-ploșniță de pat produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122645 [BB7] și un agent de detectare. În anumite variante de realizare, compoziția cuprinde un anticorp monoclonal anti-ploșniță de pat produs de hibridomul depus la ATCC sub Numărul de Acces PTA-122645 [BB7] și un anticorp conjugat care cuprinde anticorpul monoclonal anti-ploșniță de pat produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122644 [BB2] și un agent de detectare.

Prezenta invenție se referă la o trusă care cuprinde oricare dintre invențiile sau variantele de realizare de mai sus, sau o combinație a acestora.

Prezenta invenție se referă la un hibridom capabil să producă un anticorp monoclonal anti-insectă de pat, în care hibridomul este depus la ATCC cu numărul de acces PTA-122644 [BB2] sau în care hibridomul este depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122645 [BB7].

Prezenta invenție se referă la o celulă izolată care produce un anticorp monoclonal anti-insectă de pat sau un fragment de legare la antigen din oricare dintre invențiile de mai sus.

Prezenta invenție se referă la o metodă de producere a unui anticorp monoclonal anti-ploșniță de pat sau a unui fragment de legare la antigen al oricăreia dintre invențiile de mai sus, cuprinzând cultivarea unei celule izolate care produce anticorpul monoclonal anti-insectă de pat sau fragmentul de legare la antigen și izolarea anticorpului sau fragmentului de legare a antigenului din celula cultivată.

Prezenta invenție se referă la o metodă de detectare a ploșnițelor de pat, care cuprinde punerea în contact a unei probe care cuprinde un antigen de ploșniță de pat cu oricare dintre anticorpii monoclonali anti-ploșnițe, fragmente de legare la antigen, anticorpi conjugați sau fragmente de legare la antigen conjugat sau compoziții din invențiile sau variantele de mai sus, sau o combinație a acestora, și detectarea legării antigenului de ploșniță de pat la anticorpul monoclonal anti-insectă de pat sau fragmentul de legare la antigen, anticorpul conjugat sau fragmentul de legare la antigenul conjugat, compoziția sau combinația acestora. În anumite variante de realizare, proba este pusă în contact cu un anticorp monoclonal anti-insecte de pat din oricare dintre invențiile de mai sus și un anticorp conjugat din oricare dintre invențiile sau variantele de mai sus. În anumite variante de realizare, anticorpul monoclonal anti-ploșniță de pat este produs de hibridomul depus la ATCC sub Numărul de acces PTA-122644 [BB2], iar anticorpul conjugat cuprinde anticorpul monoclonal anti-insectă de pat produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122645 [BB7] și un agent de detectare. În anumite variante de realizare, anticorpul monoclonal anti-ploșniță de pat este produs de hibridomul depus la ATCC sub Numărul de acces PTA-122645 [BB7], iar anticorpul conjugat cuprinde anticorpul monoclonal anti-insectă de pat produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122644 [BB2] și un agent de detectare. În anumite variante de realizare, detectarea cuprinde efectuarea unui test de curgere laterală. În anumite variante de realizare, metoda mai cuprinde colectarea unei probe care cuprinde antigenul de ploșniță cu un dispozitiv de colectare și extragerea antigenelor din probă. În anumite variante de realizare, dispozitivul de colectare este un tampon.

SCURTĂ DESCRIERE A FIGURILOR

Figura 1 arată rezultatele unui test de captură tip sandwich folosind anticorpii monoclonali anti-ploșniță de pat BB2 și BB7. Benzile de nitroceluloză sunt prezentate cu legarea antigenului de ploșniță indicată

prin puncte asociate cu prezența anticorpului monoclonal BB2 sau BB7 conjugat cu aur ("Detector Ab"), cu pH-ul anticorpului conjugat cu aur așa cum este indicat. Benzile de testare sunt indicate prin "ploșniță de pat" pentru antigen. Benzile de control negative sunt indicate cu "niciunul" pentru antigen, cu PBS adăugat la benzi în loc de antigenul de ploșniță. Anticorpii de captare asociați cu benzile 1-3 au fost anticorpi policlonali de iepure anti-ploșniță de pat (banda 1), anticorplul monoclonal BB2 (banda 2) și anticorplul monoclonal BB7 (banda 3).

Figurile 2-7 arată rezultatele unui imunotest cu flux lateral pentru probele de tampon obținute din nivelurile notate de infestare a ploșnițelor de pat, cu nivelul 0 care nu conține ploșnițe și nivelul 8 care conține cel mai înalt nivel de ploșnițe. Probele de tampon au fost extrase în tampon de extracție 1 care conține 1X Tris-HCl (pH 7,6), 0,05 % NaN_3 , 0,1 % BSA și 0,1 % Tween-20 și diluțiile notate au fost aplicate pe benzile de testare. "Tampon" indică o bandă de test de control negativ în care a fost aplicat tamponul 1 în loc de o probă de tampon. Toate benzile conțin o bandă de control pozitiv de anticorp anti-șoarece de capră, care este situat deasupra unei benzi de anticorpi de captare BB7 pentru legarea antigenului de ploșniță. Dungile devin detectabile vizual numai la legarea anticorpului monoclonal BB2 de șoarece conjugat cu aur la banda de control pozitiv de capră anti-șoarece sau la antigenul imobilizat de ploșnițe capturat de banda BB7. Linia de pe banda "Tampon" și liniile corespunzătoare de pe benzile de testare sunt controalele pozitive care indică legarea anticorpului de capră anti-șoarece la anticorplul detector BB2 conjugat cu aur. Doar controalele pozitive sunt detectabile în **Figura 2** din cauza absenței antigenului. Liniile de sub linia de control pozitiv în **Figurile 3-7** indică legarea anticorpului BB2 conjugat cu aur la antigenul imobilizat de ploșnițe capturat de banda BB7. **Figurile 6-7** arată murdărie și reziduuri vizibile pentru mostrele mai puțin diluate în partea de jos a benzilor de testare asociate cu nivelurile mai ridicate de infestare a ploșnițelor de pat.

Figurile 8A și 8B sunt grafice bazate pe măsurători efectuate de cititorul de benzi de testare Axxin a probelor de tampon pentru nivelurile 2, 4 și 8 extrase în tamponul 1. În **Figura 8A**, "concentrația" pe axa x este diluția asociată cu probele de tampon măsurate, iar axa y este valoarea pentru "aria liniei de testare" furnizată de cititorul de benzi de testare Axxin. În **Figura 8B**, valoarea obținută pentru tamponul 1 ca martor negativ (adică "Bo") a fost împărțită singură pentru a produce o valoare normalizată de 1. Citirea controlului negativ (Bo) a fost apoi împărțită la aria liniei de testare (B) pentru fiecare diluare a probei de testat la nivelul, unde valori mai mici sub 1 sugerează cantități mai mari de antigen de ploșniță, iar valorile de peste 1 indică absența antigenului de ploșniță.

Figurile 9-11 arată rezultatele unui imunotest cu flux lateral pentru probele de tampon obținute din nivelurile notate de infestare a ploșnițelor de pat. Probele de tampon au fost extrase în tampon de extracție 2 care conține 1X Tris-HCl (pH 7,6), 0,05 % NaN_3 , 0,1 % BSA și 0,2 % Tween-20 și diluțiile notate au fost aplicate pe benzile de testare. **Figura 11** prezintă murdărie vizibilă și reziduuri pentru probele mai puțin diluate în partea de jos a benzilor de testare asociate cu nivelurile mai ridicate de infestare a ploșnițelor de pat. Etichetarea benzilor și interpretarea rezultatelor sunt cele descrise pentru **Figurile 2-7**.

Figurile 12A și 12B sunt grafice bazate pe măsurători efectuate de cititorul de benzi de testare Axxin a probelor de tampon pentru nivelurile 4, 5 și 8 extrase în tamponul 2. Etichetarea graficelor este așa cum este descrisă pentru **Figurile 8A și 8B**.

Figurile 13-17 arată rezultatele unui imunotest cu flux lateral pentru probele de tampon obținute din nivelurile notate de infestare a ploșnițelor de pat. Probele de tampon au fost extrase în tampon de extracție 3 care conține 1X Tris-HCl (pH 7,6), 0,05 % NaN_3 , 0,25 % BSA și 0,1 % Tween-20 și diluțiile notate au fost aplicate pe benzile de testare. **Figurile 16-17** arată murdărie și reziduuri vizibile pentru mostrele mai puțin diluate în partea de jos a benzilor de testare asociate cu nivelurile mai ridicate de infestare a ploșnițelor de pat. Etichetarea benzilor și interpretarea rezultatelor sunt cele descrise pentru **Figurile 2-7**.

Figurile 18A și 18B sunt grafice bazate pe măsurători efectuate de cititorul de benzi de testare Axxin a probelor de tampon pentru nivelurile 2, 5 și 8 extrase în tamponul 3. Etichetarea graficelor este așa cum este descrisă pentru **Figurile 8A și 8B**.

Figurile 19A și 19B sunt grafice bazate pe măsurători efectuate de cititorul de benzi de testare Axxin care arată o comparație a rezultatelor pentru probele de tampon de nivel 8 extrase în tampoanele 1, 2 și 3. Etichetarea graficelor este așa cum este descrisă pentru **Figurile 8A și 8B**.

Figura 20 este un grafic bazat pe măsurători efectuate de cititorul de benzi de testare Axxin pentru nouă replici ale tamponului de extracție 1 ca martor negativ și nouă replici fiecare dintre diluțiile 1/2048, 1/512 și 1/128 pentru probe de tampon de nivel 7 extrase în tamponul 1. Axa x indică cele nouă replici prin număr de "probă"; axa y este cea descrisă pentru **Figura 8A**.

DESCRIERE DETALIATĂ

Aici sunt furnizați anticorpi monoclonali și fragmente de legare la antigen ale acestora care se leagă la un antigen de ploșniță, compoziții și truse care cuprind anticorpi și fragmente de legare la

antigen, hibridoame, celule izolate capabile să producă anticorpi și fragmente de legare la antigen, metode de producere de anticorpi și fragmente de legare la antigen și metode de utilizare a anticorpilor și fragmente de legare a antigenului în detectarea ploșnițelor de pat.

5 Terminologie

Așa cum este utilizat aici, termenul "ploșniță de pat" se referă la oricare specie *Cimex* sau tulpină a acesteia.

Termenii "anticorp" și "anticorpi" sunt termeni din domeniu și pot fi utilizați aici interschimbabil pentru a se referi la o moleculă sau molecule cu un situs de legare la antigen care leagă în mod specific un antigen.

Termenul "anticorp monoclonal" se referă la o populație omogenă de anticorpi implicată în recunoașterea specifică și legarea unui singur determinant antigenic, sau epitop. Acest lucru este în contrast cu anticorpii policlonali care includ în mod tipic anticorpi diferiți direcționați împotriva diferiților determinanți antigenici. Mai mult, "anticorp monoclonal" se referă la astfel de anticorpi fabricați în orice număr de moduri, incluzând, dar fără a se limita la, prin hibridom, selecție de fagi, expresie recombinată și animale transgenice.

Termenul "fragment de legare la antigen" se referă la o porțiune a unui anticorp care este capabilă să se lege specific la un antigen. Exemplele de fragmente de anticorpi includ, dar nu se limitează la, fragmente de regiune variabilă de lanț greu, fragmente de regiune variabilă de lanț ușor, Fab, Fab', F(ab')₂, fragmente scFv, fragmente Fv, anticorpi liniari, anticorpi cu lanț unic, anticorpi multispecifici, minicorpi, diacorpi, triacorpi și tetracorpi.

Termenii "regiune variabilă" sau "domeniu variabil" sunt termeni tehnici și pot fi utilizați în mod interschimbabil aici pentru a se referi la o porțiune a unui anticorp care diferă mult ca secvență între anticorpi și este utilizată în legarea și specificitatea unui anumit anticorp pentru antigenul special al acestuia. Regiunile variabile ale lanțului greu și ușor constau fiecare din patru regiuni cadru (FR) conectate prin trei regiuni de determinare a complementarității (CDR), cunoscute și ca regiuni hipervariabile. CDR-urile din fiecare lanț contribuie la formarea situsului de legare la antigen al anticorpilor.

Termenul "se leagă specific" se referă la molecule care se leagă la un antigen (de ex., epitop sau complex imun) ca o astfel de legare este înțeleasă de un specialist în domeniu. De exemplu, o moleculă care se leagă specific la un antigen se poate lega la alte peptide sau polipeptide, în general cu afinitate mai mică, determinată de: *de ex.*, imunoteste, BIAcore®, instrument KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Boise, ID) sau alte teste cunoscute în domeniu.

Așa cum este utilizat aici, termenul "detectare" cuprinde detectarea cantitativă și calitativă.

Așa cum este utilizat aici, termenul "cantitate eficientă" se referă la cantitatea care realizează un efect dorit.

Așa cum sunt utilizați aici, termenii "celulă gazdă" și "celulă" pot fi utilizați interschimbabil și se pot referi la orice tip de celulă, de ex., o celulă primară, o celulă în cultură sau o celulă dintr-o linie celulară, incluzând un hibridom.

Un anticorp, un fragment de legare la antigen, o celulă gazdă și o celulă la care se face referire aici include forme "izolate" care au fost separate sau recuperate dintr-o componentă a mediului lor nativ, cum ar fi separarea sau îndepărtarea de contaminanți care ar interfera cu utilizările anticorp, fragment de legare la antigen, celulă gazdă sau celulă, în care astfel de contaminanți pot include enzime, hormoni și alte materiale proteice sau neproteice.

Anticorpi monoclonali, compoziții, truse, hibridoame, polipeptide, polinucleotide, vectori, celule și metode de producere

Prezenta invenție se referă la un anticorp monoclonal anti-insectă de pat produs de hibridomul depus la American Type Culture Collection (ATCC) cu numărul de acces PTA-122644, sau un fragment de legare la antigen al acestuia. Anticorpul monoclonal anti-insectă de pat desemnat aici ca BB2 este produs de hibridomul depus la ATCC cu numărul de acces PTA-122644.

Prezenta invenție se referă la un anticorp monoclonal anti-insectă de pat produs de hibridomul depus la ATCC sub Numărul de Acces PTA-122645, sau un fragment al acestuia de legare la antigen. Anticorpul monoclonal anti-insectă de pat desemnat aici ca BB7 este produs de hibridomul depus la ATCC cu numărul de acces PTA-122645.

Aici sunt dezvăluite un anticorp monoclonal sau un fragment de legare la antigen al acestuia care cuprinde regiunile de determinare a complementarității lanțului greu și lanțului ușor (CDR) ale anticorpului produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122644 [BB2] sau anticorpul produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122645 [BB7] (*vezi, de ex.,*

discuția despre CDR-uri în Kabat și colab., Departamentul de Sănătate și Servicii Umane din SUA, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983), și Chothia și colab., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Metodele pentru determinarea CDR-urilor sunt binecunoscute, inclusiv o abordare bazată pe variabilitatea secvenței între specii (adică, Kabat și colab. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (ed. a 5-a, 1991, National Institutes of Health, Bethesda, MD)), și o abordare bazată pe studii cristalografice ale complexelor antigen-anticorp (Al-lazikani și colab., J. Molec. Biol. 273:927-948 (1997)). În plus, combinațiile acestor două abordări pot fi utilizate pentru a determina CDR-urile. De asemenea, CDR-urile pot fi determinate în conformitate Lefranc M-P și colab., The Immunologist 7: 132-136 (1999); Lefranc M-P, și colab., Nucleic Acids Res 27: 209-212 (1999); MacCallum RM și colab., J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996); Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains", în Antibody Engineering, Kontermann and Dübél, ed., Capitolul 31, p. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001); și software-ul de modelare a anticorpilor AbM de la Oxford Molecular (Oxford Molecular Group, Inc.).

În anumite aspecte ale dezvoltării, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia cuprinde regiunile variabile ale lanțului greu și ușor ale anticorpului produs de hibridomul produs la ATCC sub numărul de acces PTA-122644 [BB2] sau anticorpul produs de hibridomul produs la ATCC sub Numărul de Acces PTA-122645 [BB7]. În general, o regiune variabilă este situată la aproximativ 110 până la 120 de aminoacizi amino-terminali în lanțul greu matur și aproximativ 90 până la 115 aminoacizi în lanțul ușor matur.

În anumite aspecte ale dezvoltării, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia cuprinde lanțurile grele și ușoare ale anticorpului produs de hibridomul produs la ATCC sub numărul de acces PTA-122644 [BB2] sau anticorpul produs de hibridomul produs la ATCC sub numărul de acces PTA-122645 [BB7]. Fiecare lanț greu cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu și o regiune constantă a lanțului greu. Regiunea constantă a lanțului greu cuprinde trei domenii, CH1, CH2 și CH3. Fiecare lanț ușor cuprinde o regiune variabilă a lanțului ușor și o regiune constantă a lanțului ușor. Regiunea constantă a lanțului ușor cuprinde un domeniu (CL1).

Anticorpii monoclonali ai dezvoltării pot include, dar nu se limitează la, anticorpi produși recombinant, anticorpi umani, anticorpi umanizați, anticorpi himerici, anticorpi multispecifici, cum ar fi anticorpi bispecifici, proteine de fuziune care cuprind o porțiune de determinare a antigenului unui anticorp și orice alte modificări de moleculă de imunoglobulină cuprinzând un situs de recunoaștere a antigenului atât timp cât anticorpul prezintă activitatea dorită. Anticorpul pot fi de orice tip (*de ex.*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA sau IgY), orice clasă (*de ex.*, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, sau IgA₂), sau orice subclasă (*de ex.*, IgG_{2a} sau IgG_{2b}) a moleculei de imunoglobulină. Tehnicile pentru producerea de anticorpi vor fi evidente pentru un specialist în domeniu.

Anticorpul monoclonali pot fi preparați, de exemplu, folosind metode de hibridome, cum ar fi cele descrise de Kohler și Milstein, Nature 256:495 (1975). Folosind metoda hibridomului, un soarece, hamster sau alt animal gazdă adecvat este imunizat pentru a provoca producerea de către limfocite a anticorpilor care se vor lega în mod specific la un antigen de imunizare. Limfocitele pot fi, de asemenea, imunizate *in vitro*. După imunizare, limfocitele sunt izolate și fuzionate cu o linie celulară de mielom adecvată utilizând, de exemplu, polietilenglicol, pentru a forma celule de hibridom care pot fi apoi selectate din limfocitele nefuzionate și celulele de mielom.

Anticorpul monoclonali pot fi, de asemenea, fabricați folosind metode de ADN recombinant așa cum este descris în brevetul U.S. 4.816.567. Polinucleotidele care codifică un anticorp monoclonal sunt izolate din celule B mature sau celule hibridom, cum ar fi prin RT-PCR utilizând primeri oligonucleotidici care amplifică în mod specific genele care codifică lanțurile grele și ușoare ale anticorpului, iar secvența lor este determinată folosind proceduri convenționale. Polinucleotidele izolate care codifică lanțurile grele și ușoare sunt apoi clonate în vectori de expresie adecvați, care permit generarea de anticorpi monoclonali atunci când sunt transfectate în celule gazdă, incluzând, dar fără a se limita la, celule de *E. coli*, celule COS simiene, celule ovariene de hamster chinezesc (CHO) sau celule de mielom. De asemenea, anticorpul monoclonali recombinanți sau fragmente ale acestora din speciile dorite pot fi izolați din bibliotecile de prezentare a fagilor care exprimă CDR-urile speciilor dorite (*vezi*, de ex., McCafferty și colab., Nature 348:552-554 (1990); Clackson și colab., Nature 352:624-628 (1991); și Marks și colab., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)).

Fragmentele de legare la antigen ale invenției pot fi produse prin orice metodă cunoscută și includ o porțiune dintr-un anticorp care este capabil să se lege în mod specific la un antigen. Exemplele de fragmente de anticorpi includ, dar nu se limitează la, fragmente de regiune variabilă de lanț greu, fragmente de regiune variabilă de lanț ușor, Fab, Fab', F(ab')₂, fragmente scFv, fragmente Fv, anticorpi liniari, anticorpi cu un singur lanț, anticorpi multispecifici, minicorpi, diacorpi, triacorpi și tetracorpi (*vezi*, de ex., Hudson și Souriau, Nature Med. 9: 129-134 (2003) și brevetul U.S. 5.641.870). În mod

tradițional, aceste fragmente sunt derivate prin digestia proteolitică a anticorpilor intacti (vezi, de ex., Morimoto și colab., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1993)); Brennan și colab., Science 229:81 (1985)). În anumite variante de realizare, fragmentele de anticorpi sunt produse recombinant. De exemplu, fragmentele de anticorpi pot fi exprimate în și secretate din *E coli* sau alte celule gazdă, permițând astfel producerea unor cantități mari de fragmente. Astfel de fragmente de anticorpi pot fi, de asemenea, izolate din bibliotecile de anticorpi fagi. Alte tehnici pentru producerea de fragmente de anticorpi vor fi evidente pentru specialistul în domeniu.

În anumite variante de realizare, oricare dintre anticorpii menționați mai sus sau fragmentele acestora de legare la antigen este capabil să se lege la un antigen de ploșnițe de pat într-un lizat de ploșnițe întregi sau un extract de hârtie de colectare care cuprinde material rezidual de ploșnițe de pat. Metodele de producere a lizateelor de ploșnițe întregi și a extractelor de hârtie de colectare cuprinzând deșeuri de ploșnițe de pat vor fi evidente pentru specialistul în domeniu, pe baza tehnicilor de extracție cunoscute și a metodelor dezvoltate în Exemplul 1. Ploșnițele întregi includ nimfe, masculii și/sau femelele pot fi obținute dintr-o zonă de infestare sau dintr-o colonie de ploșnițe de pat menținută experimental sau comercial și pot include orice specii *Cimex* sau tulpini, inclusiv, dar fără a se limita la, *Cimex lectularius* și tulpina Harlan. Hârtia de colectare care cuprinde deșeurile de ploșnițe de pat poate include excremente de ploșnițe și/sau țesuturi, de exemplu, și poate fi obținută din surse comerciale, așa cum s-a discutat în Exemplul 1.

De asemenea, aici este dezvoltat un mutant al anticorpului produs de hibridomul depus la ATCC cu numărul de acces PTA-122644 [BB2] sau de anticorpul produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122645 [BB7]. Mutații pot conține, de exemplu, mutații de substituție conservatoare, adică substituția unui aminoacid cu aminoacizi similari. De exemplu, substituția conservatoare se referă la înlocuirea unui aminoacid cu altul din aceeași clasă generală, cum ar fi, de exemplu, un aminoacid acid cu un alt aminoacid acid, un aminoacid bazic cu un alt aminoacid bazic sau un aminoacid neutru, de un alt aminoacid neutru. Ceea ce se intenționează printr-o substituție conservatoare a aminoacizilor este bine cunoscut în domeniu. Mutațiile pot include, de asemenea, ștergeri, inserții, inversări și repetări. Mutațiile pot fi introduse prin metode de biologie moleculară generală cunoscute în domeniu, incluzând, dar fără a se limita la, PCR predispusă la erori, mutageneza direcționată pe oligonucleotide, mutageneza direcționată pe situs și amestecarea lanțului greu sau ușor.

De asemenea, aici este dezvoltat un anticorp monoclonal sau un fragment de legare la antigen al acestuia având una sau mai multe caracteristici care sunt în mod substanțial similare cu cele ale anticorpului produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122644 [BB2] sau anticorpul produs de către hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122645 [BB7]. Expresia "substanțial similară" așa cum este utilizată aici denotă un grad suficient de mare de similitudine între două caracteristici, astfel încât un specialist în domeniu ar considera diferența ca fiind mică sau deloc semnificativă biologic și/sau statistic. În anumite variante de realizare, diferența dintre două valori numerice poate fi mai mică de aproximativ 15%, 10%, 5%, 2% sau 1%. Caracteristicile anticorpilor depuși pot include una sau mai multe proprietăți, cum ar fi, dar fără a se limita la, specificitatea de legare (de ex., valoarea Kd), determinanți/epitopi antigenici și secvențe de polinucleotide sau polipeptide. În anumite aspecte ale dezvoltării, anticorpul monoclonal sau fragmentul de legare la antigen al acestuia are o secvență de polinucleotidă sau polipeptidă care este de cel puțin 90%-99%, cel puțin 95%-99%, cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98% sau cel puțin 99% identică cu secvența polinucleotidică sau polipeptidică a anticorpului produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122644 [BB2] sau anticorpul produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122645 [BB7]. În anumite aspecte ale dezvoltării, anticorpul monoclonal sau fragmentul de legare la antigen al acestuia are una sau mai multe dintre aceleași caracteristici ca și anticorpul produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122644 [BB2] sau anticorpul produs de către hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122645 [BB7]. În anumite aspecte ale dezvoltării, anticorpul monoclonal sau fragmentul de legare la antigen al acestuia se leagă la același determinant/epitop antigenic ca și anticorpul produs de hibridomul depus la ATCC cu numărul de acces PTA-122644 [BB2] sau anticorpul produs de către hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122645 [BB7].

Termenul "epitop" sau "determinant antigenic" poate fi utilizat aici în mod interschimbabil pentru a se referi la acea porțiune a unui antigen capabilă să fie recunoscută și legată în mod specific de un anumit anticorp. Un epitop include de obicei cel puțin 3, și mai uzual, cel puțin 5 sau 8-10 aminoacizi într-o conformație spațială unică. Un epitop poate fi, de exemplu, din aminoacizi contigui ai unei polipeptide (epitop liniar sau contiguu) sau un epitop poate, de exemplu, să vină împreună din două sau mai multe regiuni necontigue ale unei polipeptide sau polipeptide (conformaționale, neliniare, epitop discontinuu sau necontiguu). Epitopul la care se leagă la un anticorp poate fi determinat, de ex., prin

spectroscopie RMN, studii de cristalografie cu difracție de raze X, teste ELISA, schimb hidrogen/deuteriu cuplat cu spectrometrie de masă (de ex., spectrometrie de masă cu electrospray prin cromatografie lichidă), teste de scanare a oligo-peptidelor bazate pe matrice și/sau cartografiere a mutagenezei (de ex., cartografierea mutagenezei dirijate pe situs). Pentru cristalografia cu raze X, cristalizarea poate fi realizată folosind oricare dintre metodele cunoscute în domeniu (de ex., Giegé R și colab., (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1-23; Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6300-6303). Anticorp: cristalele de antigen pot fi studiate folosind tehnici bine cunoscute de difracție cu raze X și pot fi rafinate folosind software de calculator precum X-PLOR (Yale University, 1992, distribuit de Molecular Simulations, Inc.; vedea, de exemplu., *Meth Enzymol* (1985) volumele 114 și 115, eds Wyckoff HW și colab.; U.S. 2004/0014194), și BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P și colab., (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Pt 10): 1316-1323). Studiile de cartografiere a mutagenezei pot fi realizate folosind orice metodă cunoscută unui specialist în domeniu. *Vezi, de ex.*, Champe M și colab., (1995) *J Biol Chem* 270: 1388-1394 și Cunningham BC & Wells JA (1989) *Science* 244: 1081-1085 pentru o descriere a tehnicilor de mutagenză, inclusiv tehnicile de mutagenză cu scanare al alaninei.

Prezenta invenție este direcționată la un anticorp monoclonal conjugat sau un fragment conjugat de legare la antigen care cuprinde oricare dintre anticorpilor monoclonali anti-insecte de pat sau fragmentele de legare la antigen ale invenției și un agent de detectare. Agentul de detectare poate fi conjugat direct sau indirect cu anticorpul monoclonal anti-insectă de pat sau cu fragmentul de legare la antigen. Agentul de detectare poate fi detectabil de la sine sau, în cazul unei etichete enzimatică, poate cataliza alterarea chimică a unui compus sau compoziție de substrat care este detectabilă. Agentul de detectare include, dar nu este limitat la, un radiomarcator, un fluorofor, un cromofor, un agent de imagistică sau un metal, incluzând un ion metallic. În anumite variante de realizare, agentul de detectare este aur coloidal sau nanoparticule de aur. În anumite variante de realizare, aurul coloidal sau nanoparticulele de aur sunt compuse din particule de aur având o dimensiune de 1-300 nm, 1-250 nm, 10-200 nm, 20-150 nm, 20-100 nm, 20-80 nm, 20-60 nm, 20-50 nm, 20 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm, 60 nm, 70 nm, 80 nm, 90 nm, 100 nm, 150 nm, 200 nm, 250 nm, sau 300 nm. În anumite variante de realizare, anticorpul conjugat sau fragmentul de legare la antigenul conjugat cuprinde anticorpul monoclonal anti-insectă de pat produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122644 [BB2], sau un fragment de legare la antigen al acestuia, sau anticorpul monoclonal de insecte de pat produs de hibridomul depus la ATCC sub Numărul de Acces PTA-122645 [BB7], sau un fragment al acestuia de legare la antigen.

Prezenta invenție se referă la o compoziție care cuprinde oricare dintre anticorpilor monoclonali anti-insecte de pat sau fragmente ale acestora de legare la antigen, sau anticorpi conjugați sau fragmente conjugate de legare la antigen ale invenției, sau o combinație a acestora. În anumite variante de realizare, compoziția cuprinde anticorpul monoclonal anti-insectă de pat produs de hibridomul depus la ATCC sub Număr de acces PTA-122644 [BB2] și anticorpul monoclonal anti-insectă de pat produs de hibridomul depus la ATCC sub Număr de acces PTA-122645 [BB7]. În anumite variante de realizare, compoziția cuprinde anticorpul monoclonal anti-insectă de pat produs de hibridomul depus la ATCC sub Numărul de Acces PTA-122644 [BB2] și un anticorp conjugat care cuprinde anticorpul monoclonal anti-insectă de pat produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122645 [BB7] și un agent de detectare. În anumite variante de realizare, compoziția cuprinde anticorpul monoclonal anti-insectă de pat produs de hibridomul depus la ATCC sub Numărul de Acces PTA-122645 [BB7] și un anticorp conjugat care cuprinde anticorpul monoclonal anti-insectă de pat produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122644 [BB2] și un agent de detectare.

Prezenta invenție se referă la o trusă care cuprinde oricare dintre anticorpilor monoclonali anti-insecte de pat sau fragmente ale acestora de legare la antigen, anticorpi conjugați sau fragmente conjugate de legare la antigen, sau compoziții ale invenției sau o combinație a acestora. În anumite variante de realizare, o trusă cuprinde cel puțin o componentă într-unul sau mai multe containere. În unele variante de realizare, trusa cuprinde componente necesare și/sau suficiente pentru a efectua un test de detectare, inclusiv controale, instrucțiuni pentru efectuarea testelor, orice dispozitiv necesar și/sau software pentru analiza și prezentarea rezultatelor. Dispozitivele adecvate includ cele dezvoltate în aplicația din S.U.A. publicată ca US20170115301 on April 27, 2017, intitulat "Bed Bugs Detection Device", și cererea neprovizorie din S.U.A. și cererea internațională PCT a acesteia depuse la 21 octombrie 2016, precum și Brevetul U.S. Nr. 7.220.597 și 7.214.542.

Prezenta invenție se referă la un hibridom capabil să producă un anticorp monoclonal anti-insectă de pat, în care hibridomul este depus la ATCC cu numărul de acces PTA-122644 [BB2] sau în care hibridomul este depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122645 [BB7].

Este dezvăluită aici o polipeptidă izolată care cuprinde o secvență de aminoacizi cel puțin 90%-99%, cel puțin 95%-99%, cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98%. % sau cel puțin 99% identică cu o secvență de aminoacizi a unei regiuni variabile a lanțului greu sau ușor, sau a unui lanț greu sau ușor, a anticorpului produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122644 [BB2] sau anticorp produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122645 [BB7]. În anumite aspecte ale dezvoltării, polipeptida cuprinde secvențele de aminoacizi ale CDR-urilor unei regiuni variabile de lanț greu sau ușor a anticorpului produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122644 [BB2] sau anticorpul produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122645 [BB7]. În anumite aspecte ale dezvoltării, polipeptida cuprinde secvențele de aminoacizi ale regiunii variabile ale lanțului greu sau ușor, sau ale lanțului greu sau ușor ale anticorpului produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122644 [BB2] sau anticorpul produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122645 [BB7].

Aici este dezvăluită o polinucleotidă izolată care cuprinde o secvență de acizi nucleici cel puțin 90%-99%, cel puțin 95%-99%, cel puțin 90%, cel puțin 95%, cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98%. % sau cel puțin 99% identică cu o secvență de acid nucleic care codifică o regiune variabilă a lanțului greu sau ușor, sau un lanț greu sau ușor, a anticorpului produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122644 [BB2] sau anticorp produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122645 [BB7]. În anumite aspecte ale dezvoltării, polinucleotida cuprinde secvențe de acizi nucleici care codifică CDR-urile unei regiuni variabile de lanț greu sau ușor a anticorpului produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122644 [BB2] sau anticorpul produs de către hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122645 [BB7]. În anumite aspecte ale dezvoltării, polinucleotida cuprinde o secvență de acizi nucleici care codifică regiunea variabilă a lanțului greu sau ușor, sau lanțul greu sau ușor al anticorpului produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122644 [BB2] sau anticorpul produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122645 [BB7].

Aici este dezvoltat un vector care cuprinde una sau mai multe dintre polinucleotidele izolate ale dezvoltării. În anumite aspecte ale dezvoltării, vectorul este un vector de expresie.

Prezenta invenție se referă la o celulă izolată care produce un anticorp monoclonal anti-insectă de pat sau un fragment de legare la antigen al invenției. În anumite variante de realizare, celula este un hibridom. În anumite aspecte ale dezvoltării, celula cuprinde unul sau mai mulți vectori ai dezvoltării. În anumite aspecte ale dezvoltării, celula cuprinde una sau mai multe polinucleotide ale dezvoltării.

Prezenta invenție este direcționată la o metodă de producere a unui anticorp monoclonal anti-ploșniță de pat sau a unui fragment de legare a antigenului conform invenției, cuprinzând cultivarea unei celule izolate care produce anticorpul monoclonal anti-ploșniță de pat sau fragmentul de legare la antigen și izolarea anticorpului sau fragmentului de legare a antigenului din celula cultivată.

Celulele includ, dar nu sunt limitate la, hibridoame, procariote, drojdie, insecte sau celule eucariote superioare. Hibridoamele care produc anticorpi monoclonali pot fi propagate fie cultură *in vitro* folosind metode standard (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986) sau *in vivo* ca tumori ascitice la un animal. Procariotele includ organisme gram negative sau gram pozitive, de exemplu *E coli* sau bacili. Celulele eucariote superioare includ, dar nu sunt limitate la, linii celulare stabile de origine mamiferă. Exemplele de linii celulare de mamifere adecvate includ linii celulare COS-7, L, C127, 3T3, ovar de hamster chinezesc (CHO), HeLa și BHK. În anumite variante de realizare, oricare dintre anticorpii monoclonali anti-insecte de pat sau fragmentele de legare la antigen ale invenției sunt produse de celule izolate după transfecția celulelor cu vectori care cuprind polinucleotide care codifică secvențele anticorpilor monoclonali anti-insecte de pat sau fragmentele de legare la antigen ale invenției. Vectorii adecvați de clonare și expresie pentru utilizare cu gazde celulare bacteriene, fungice, drojdie și mamifere sunt descriși de Pouwels și colab. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985). Vectorii de expresie de la mamifere pot cuprinde elemente netranscrise, cum ar fi o origine de replicare, un promotor și un amplificator adecvat legat de gena care urmează să fie exprimată și alte secvențe netranscrise 5' sau 3' de flancare și secvențe netranlate 5' sau 3', cum ar fi situsuri necesare de legare a ribozomilor, un situs de poliadenilare, situsuri donor și acceptor de îmbinare și secvențe de terminare a transcripției. Sistemele de baculovirus pentru producerea de proteine heterologe în celulele de insecte sunt revizuite de Luckow și Summers, Bio/Technology 6:47 (1988).

Anticorpii monoclonali anti-insecte de pat sau fragmentele de legare la antigen ale invenției pot fi izolați din celule sau mediul de cultură sau din fluidul de ascită pentru propagarea *in vivo* a hibridoamelor. Izolarea anticorpilor monoclonali anti-insecte de pat sau a fragmentelor de legare la antigen poate fi conform oricărei metode adecvate. Astfel de metode standard includ cromatografia (de ex., cromatografia pe coloană cu schimb de ioni, de afinitate și după dimensiune), centrifugare, solubilitate diferențială sau prin orice altă tehnică standard pentru purificarea proteinelor. Metodele

cunoscute în domeniu pentru purificarea anticorpilor și a altor proteine includ, de exemplu, cele descrise în publicațiile de brevet U.S. Nr. 2008/0312425, 2008/0177048, și 2009/0187005.

Metode de detectare a ploșnițelor de pat

Prezenta invenție este direcționată la o metodă de detectare a ploșnițelor de pat, care cuprinde punerea în contact a unei probe care cuprinde un antigen de ploșniță de pat cu oricare dintre anticorpii monoclonali anti-ploșnițe, fragmente de legare la antigen, anticorpi conjugați sau fragmente de legare la antigen conjugat sau compoziții din invenție, sau o combinație a acestora, și detectarea legării antigenului de ploșniță de pat la anticorpus monoclonal anti-insectă de pat sau fragmentul de legare la antigen, anticorpus conjugat sau fragmentul de legare la antigenul conjugat, compoziția sau combinația acestora. "O probă" include, dar nu se limitează la, ploșnițe întregi, părți de ploșnițe de pat, deșeuri de ploșnițe de pat, lizate sau extracte ale acestora, extrase de hârtie de colectare care cuprind deșeuri de ploșnițe de pat și fluide care le conțin.

Contactarea poate fi prin orice metodă adecvată. În anumite variante de realizare, punerea în contact se face prin aplicarea unei probe care cuprinde antigenul de ploșniță de pat la un anticorpus monoclonal anti-insectă de pat, fragment de legare a antigenului, anticorpus conjugat sau fragment de legare a antigenului conjugat sau compoziție conform invenției sau o combinație a acestora care este imobilizată sau situată în alt mod pe o suprafață. Orice suprafață acceptabilă poate fi utilizată, după cum va fi apreciat de către specialistul în domeniu, incluzând, dar fără a se limita la, o membrană de nitroceluloză sau un tampon compus dintr-un material adecvat, și poate include un tip sandwich, godeu sau cu curgere laterală. În anumite variante de realizare, proba este pusă în contact cu un anticorpus monoclonal anti-insecte de pat conform invenției și un anticorpus conjugat conform invenției. În anumite variante de realizare, anticorpus monoclonal anti-ploșniță de pat este produs de hibridomul depus la ATCC sub Numărul de acces PTA-122644 [BB2], iar anticorpus conjugat cuprinde anticorpus monoclonal anti-insectă de pat produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122645 [BB7] și un agent de detectare. În anumite variante de realizare, anticorpus monoclonal anti-ploșniță de pat este produs de hibridomul depus la ATCC sub Numărul de acces PTA-122645 [BB7], iar anticorpus conjugat cuprinde anticorpus monoclonal anti-insectă de pat produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122644 [BB2] și un agent de detectare. În anumite variante de realizare, punerea în contact mai cuprinde punerea în contact a anticorpusului monoclonal anti-insectă de pat, a fragmentului de legare a antigenului, a anticorpusului conjugat sau a fragmentului de legare a antigenului conjugat sau a compoziției conform invenției sau a unei combinații a acestora cu o probă martor pentru comparare cu proba de testare.

Detectarea poate fi prin orice metodă adecvată și poate include detectarea cantitativă sau calitativă. Astfel de metode includ, dar nu se limitează la, teste de legare a antigenului care sunt bine cunoscute în domeniu, cum ar fi testele cu flux lateral, radioimunotestele, ELISA (testul imunosorbent legat de enzime), imunotestele "sandwich", testele de imunoprecipitare, imunotestele fluorescente, imunotestele cu proteina A și imunohistochimia (IHC). Detectarea poate include analiza vizuală a unei reacții colorimetrice, fluorescente sau luminiscente, de exemplu, sau poate include utilizarea unui dispozitiv care măsoară astfel de reacții. Dispozitivele adecvate le includ pe cele dezvăluite în aplicația din S.U.A. publicată ca US20170115301 în 27 aprilie, 2017, intitulat "Bed Bugs Detection Device", și cererea neprovizorie din S.U.A. și cererea internațională PCT a acestora depuse la 21 octombrie 2016, precum și brevetele U.S. Nr. 7.220.597 și 7.214.542. În anumite variante de realizare, detectarea cuprinde efectuarea unui test de curgere laterală. În anumite variante de realizare, detectarea are loc în 1-20 minute, 1-15 minute, 1-10 minute, 1-5 minute, 20 minute sau mai puțin, 15 minute sau mai puțin, 10 minute sau mai puțin, 5 minute sau mai puțin, în 20 de minute, în 15 minute, în 10 minute sau în 5 minute.

Cantitatea de anticorpus monoclonal anti-insectă de pat, fragment de legare a antigenului, anticorpus conjugat sau fragment de legare a antigenului, compoziția conform invenției sau o combinație a acestora poate include orice cantitate eficientă, care va fi evidentă pentru un practicant calificat pe baza metodelor de detectare cunoscute și metodelor dezvăluite în exemple. Proba poate fi diluată sau nediluată.

În anumite variante de realizare, metoda mai cuprinde colectarea unei probe care cuprinde antigenul de ploșniță cu un dispozitiv de colectare și extragerea antigenelor din probă. Eșantionul poate fi colectat de pe orice suprafață asociată cu infestarea ploșnițelor de pat, inclusiv, dar fără a se limita la, lenjerie de pat, saltele, tapiserie, carpete, covoare și mobilier. Dispozitivul de colectare poate fi orice dispozitiv adecvat, incluzând, dar fără a se limita la un tampon, cum ar fi un tampon de bumbac, un aspirant sau orice material care poate fi utilizat pentru colectarea reziduurilor, inclusiv, dar fără a se limita la, un șervețel, țesătură sau prosoape. În anumite variante de realizare, dispozitivul de colectare este un tampon. În anumite variante de realizare, extragerea antigenelor din probă cuprinde solubilizarea antigenelor în probă cu un tampon de extracție. Tamponurile de extracție adecvate vor fi evidente pentru

specialistul în domeniu, având în vedere tamponalele de extracție bine-cunoscute și cele dezvoltate în exemple.

EXEMPLE

5 Exemplele din această secțiune sunt oferite cu titlu de ilustrare și nu cu titlu de limitare.

Exemplul 1: Generarea de anticorpi monoclonali anti-ploșnițe de pat

Șoarecii au fost imunizați cu lizate întregi de ploșnițe și extracte de hârtie de ploșnițe de pat (adică, extracte din hârtie de colectare a ploșnițelor de pat care conține material rezidual dintr-o colonie de ploșnițe).

10 Lizate de ploșnițe de pat întregi au fost produse de la nimfe, masculi și femele dintr-o colonie de ploșnițe (tulpina Harlan, i2LResearch USA Inc., Baltimore, Maryland, SUA) care au fost congelate și triturate în soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) 1X. Lizatele au fost clarificate cu un filtru seringă de 0,45 microni. Concentrația de proteine a fost determinată printr-un test standard al proteinei Bradford.

15 Extractele clarificate, cuantificate au fost împărțite alicote în tuburi Eppendorf de 1,5 ml și depozitate la -80 °C.

Hârtia de colectare a ploșnițelor de pat (i2LResearch USA Inc., Baltimore, Maryland, SUA) a fost tăiată în bucăți de aproximativ 1 cm² și plasate în tuburi de centrifugă din plastic de 2 ml. Extracția a fost efectuată prin adăugarea a 1,0 ml de 50 mM PBS (pH 7,4) și amestecarea tuburilor timp de 30 de minute pe un balansoar tub. După 30 de minute, extractul a fost extras complet prin trecerea amestecului printr-o seringă de 5 ml. Acest extract colectat a fost apoi utilizat pentru a obține mai mult extract din hârtie de colectare proaspătă prin adăugarea în serie a extractului la hârtia nou tăiată și repetarea procesului. Extractul final a fost apoi centrifugat la 12.000 rpm timp de 10 minute pentru a îndepărta particulele. Supernatantul a fost îndepărtat și reținut, și materialul granulat a fost aruncat. Concentrația de proteină a supernatantului a fost determinată prin testul Bradford ca fiind de 0,6 mg/ml. Soluția finală (adică "extract de hârtie de ploșniță") a fost depozitată la -20 °C.

20 Patru șoareci Balb/c în vârstă de 4-5 săptămâni (Harlan Laboratories, Inc., Indianapolis, Indiana, SUA) au fost imunizați subcutanat în spate cu 50 μg lizat întreg de ploșnițe amestecat cu 100 μl de adjuvant. Adjuvantul utilizat pentru doi dintre șoareci a fost un adjuvant tradițional (Freund's Adjuvant, Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, Missouri, SUA), iar adjuvantul utilizat pentru cei doi șoareci rămași a fost un adjuvant solubil în apă (ImmuQuik®, KCH Scientific, San Jose, California, SUA).

25 În ziua 14 după imunizarea inițială, șoarecii imunizați au fost stimulați cu 50 μg lizat întreg de ploșnițe amestecat cu 100 μl de adjuvant așa cum a fost utilizat inițial pentru fiecare șoarece. În ziua 37, serurile de la șoareci au fost testate la titru folosind un imunotest enzimatic standard, folosind anticorpi conjugați cu peroxidază de hrean de capră anti-șoarece ca anticorp secundar/conjugat de enzimă și 3,3',5,5'-tetrametilbenzidină ca substrat cromogen și 10 μg/ml lizat întreg de ploșnițe de pat ca sursă de antigen. Cei doi șoareci imunizați cu lizat întreg de ploșnițe de pat în adjuvantul solubil în apă au produs titruri mai mari. Cu toate acestea, deoarece titrurile nu au fost puternice în general, toți cei patru șoareci imunizați au fost stimulați cu o cantitate dublă de lizat de ploșnițe de pat (adică, 100 μg) în ziua 51 și apoi din nou în ziua 78. În ziua 107, cei patru șoareci au fost stimulați cu 15 μl de extract de hârtie de ploșniță.

30 În ziua 117, șoarecele cu cel mai mare titru anterior a fost testat la titru folosind lizat întreg de ploșnițe sau extract de hârtie de ploșniță ca sursă de antigen. S-a observat o reacție slabă pentru extractul de hârtie de ploșnițe de pat. În ziua 134, toți cei patru șoareci au fost stimulați cu 100 μl de extract de hârtie de ploșniță de pat folosind ImmuQuik® ca adjuvant. În ziua 151, șoarecii au fost testați la titru folosind extract de hârtie de ploșniță de pat ca sursă de antigen, și șoarecele cu cel mai mare titru a fost stimulat cu 100 μl extract de hârtie de ploșniță de pat.

35 Celulele splinei au fost colectate de la cei doi șoareci cu cel mai mare titru, unul în Ziua 154 și celălalt în Ziua 216 și au fost fuzionate cu celule de mielom murin SP 2/0 utilizând polietilenglicol. Celulele fuzionate au fost cultivate în mediu de selecție timp de 10 zile, urmate de screening cu extract de hârtie de ploșniță de pat ca sursă de antigen. Aproximativ 41 de clone pozitive au fost identificate din screeningul primar și aproximativ 25 de clone pozitive au fost confirmate în screeningul secundar. Au fost subclonate linii celulare stabile, au fost produse ascite pentru mai mult de 25 de clone și anticorpii au fost purificați (de ex., în cantități de 2-5 mg). Doi anticorpi denumiți aici anticorpi BB2 și BB7 au fost determinați prin imunotest enzimatic pentru a avea o reacție puternică cu extractul de hârtie de ploșniță de pat în comparație cu anticorpii din alte clone și au fost selectați pentru studii suplimentare. Hibridoamele producătoare de anticorpi BB2 și BB7 au fost depuse în conformitate cu Tratatul de la Budapesta la American Type Culture Collection, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, la 8 octombrie 2015, și au primit numărul de acces ATCC PTA-122644 și Nr. de acces ATCC PTA-122645, respectiv.

Exemplul 2: Testul de captură sandwich a anticorpilor monoclonali anti-ploșnițe de pat

Un test de captură tip sandwich a fost efectuat folosind anticorpul BB2 sau BB7 ca anticorp de captură și fie BB2 conjugat cu aur, fie BB7 conjugat cu aur ca anticorp detector. Extractul de hârtie de ploșniță de pat așa cum este descris în Exemplul 1 a fost utilizat ca sursă de antigen de ploșniță de pat. Un anticorp policlonal anti-ploșniță de pat de iepure, așa cum este descris în publicația U.S. Nr. 2015-0064727 a fost utilizat ca un anticorp de captură de control pozitiv și PBS a fost utilizat ca un control negativ pentru antigen.

Anticorpul BB2 conjugat cu aur (la pH 7 sau 9) sau anticorpul BB7 conjugat cu aur (la pH 9) a fost adăugat ca anticorp detector la benzi așa cum este prezentat în FIG. 1. Benzile de control negativ au arătat o absență a legării de către anticorpul detector. Benzile de testare au arătat colorarea roșie a punctelor de captură care a indicat legarea anticorpilor detector conjugati cu aur la antigenul de ploșniță de pat imobilizat pe nitroceluloză de către anticorpul de captură. După cum este rezumat în Tabelul 1, s-au observat reacții puternice cu utilizarea fie a anticorpului BB2, fie a anticorpului BB7 ca anticorp de captură. În contrast, s-au observat reacții foarte slabe (adică "+") sau incerte (adică "+/-") cu utilizarea anticorpului policlonal anti-ploșniță de pat de iepure ca anticorp de captură.

Tabelul 1: Intensități observate în testul de captură sandwich

	Captură anticorp		
Anticorp detector conjugat cu aur (pH)	Anticorp anti-ploșniță de pat policlonală de iepure	BB2	BB7
BB2 (7)	+	++++	+++
BB2 (9)	+	+++	++
BB7 (9)	+/-	++++	+++

Exemplul 3: Imunotest cu flux lateral pentru a detecta antigenele ploșnițelor de pat

Un exemplu de imunotest cu flux lateral a fost conceput pentru a detecta antigenele ploșnițelor de pat din probele prelevate prin tamponarea zonelor cu diferite niveluri de infestare a ploșnițelor de pat. Tampoanele de extracție au fost pregătite și testate pentru extracția eficientă a antigenului ploșniței de pat din tampoane, flux adecvat pe benzile de testare cu nitroceluloză și legare nespecifică scăzută până la deloc. Probele de tampon au fost extrase și diluate în serie pentru a investiga sensibilitatea testului. Precizia testului a fost investigată prin testarea replicilor și citirea intensităților semnalului folosind un cititor de benzi de testare.

Prepararea membranei de nitroceluloză: Membrane de nitroceluloză (CN 140, 25 mm, Sartorius Corp., Bohemia, New York, SUA) au fost pulverizate cu 1,0 mg/ml de anticorp BB7 anti-ploșniță de pat ca linie de testare și 0,5 mg/ml anticorp de capră anti-șoarece (Lampire Biological Laboratories, Pipersville, Pennsylvania, SUA) ca linie de control folosind un Biodot Air Jet (Biodot, Irvine, California, SUA) pentru striparea membranelor de nitroceluloză. Tamponul de stripare a fost 1X PBS, 0,2 % zaharoză, pH 7,4. Linia de testare și linia de control au fost pulverizate la o distanță de 7 mm, cu linia de testare situată la 10 mm de partea inferioară a membranei. Membranele au fost stropite la o rată de 1,0 μl/cm. Membranele au fost uscate la 37°C timp de 1 oră și depozitate într-o pungă de folie uscată. Membranele stropite au fost ținute uscate peste noapte înainte de blocare.

Blocarea membranei de nitroceluloză: După uscare peste noapte, membranele stripate au fost plasate într-o soluție de blocare (25 mM KPO₄, 0,2% cazeină, 0,5% acid boric, 0,02% zaharoză, 0,1% surfactant 10G, 0,5% PVA) cu orientarea liniei de testare în partea inferioară a nitrocelulozei și a liniei de control pe partea superioară a nitrocelulozei. Soluția de blocare a fost lăsată să treacă în partea de sus a membranei. Membranele au fost îndepărtate din soluția de blocare și plasate într-un suport pentru degete pentru a se usca la 37°C timp de 1 oră. Membranele blocate au fost păstrate uscate într-o pungă de plastic și depozitate într-o cameră uscată.

Conjugarea anticorpilor cu aur: O casetă de dializă Slide-A-Lyzer™ (limită a greutatea moleculare de 10000, Thermo Fisher Scientific Inc., Carlsbad, California, SUA) a fost utilizată pentru a dializa anticorpul BB2 anti-ploșnițe peste noapte în 10 mM KPO₄, pH 7,4. Concentrația finală a anticorpului BB2 după dializare a fost de 0,875 mg/ml. O soluție de aur coloidal care conținea particule de 40 nm și o densitate optică (OD) de 2,28 la 525 nm a fost ajustată la temperatura camerei la pH 8,6 cu

0,1 M K_2CO_3 proaspăt preparat. Anticorpul BB2 dializat a fost adăugat la soluția de aur coloidal în timp ce se agita în vortex. Soluția a fost incubată timp de 30 de minute pe un rotator la temperatura camerei. Conjugatul a fost blocat cu 10 μ l (pentru fiecare 1 ml de aur coloidal OD 2) de tampon de blocare conjugat cu aur (25 mM KPO_4 , 0,2% Bioterge, 6% BSA, 0,3% zaharoză) pe un rotator la temperatura camerei timp de 10 minute. Conjugatul de aur a fost centrifugat la 12000 RPM, 4°C timp de 20 de minute și supernatantul a fost aruncat. Peletul de conjugat a fost resuspendat cu 0,2 ml (pentru fiecare 1 ml de aur coloidal OD 2) tampon de resuspensie (diluție 1:5 de tampon de blocare conjugat cu aur în 25 mM KPO_4 , 0,05% azidă de sodiu). OD-ul anticorpului BB2 conjugat cu aur a fost verificat folosind un spectrofotometru și ajustat la 10. Anticorpul BB2 conjugat cu aur a fost depozitat la 4°C.

Prepararea tamponului conjugat de aur: S-a folosit o pipetă P-1000 pentru a satura tampoane conjugate din fibră de sticlă Ahlstrom 8950 de 300 mm (Ahlstrom, Helsinki, Finlanda) cu tampon de blocare (25 mM KPO_4 , 0,2% cazeină, 0,5% acid boric, 0,02% zaharoză, 0,1% surfactant 10G, 0,5% PVA). După 15 minute, tampoanele conjugate saturate au fost transferate pe un prosop de hârtie timp de un minut. Apoi, tampoanele conjugate au fost plasate pe un suport pentru degete pentru a se usca la 37°C timp de 1 oră. Tampoanele conjugate blocate au fost introduse într-o pungă de plastic cu exicatorare și depozitate într-o cameră uscată. Anticorpul BB2 conjugat cu aur OD10 a fost preparat prin adăugarea de 10% zaharoză și 5% trehaloză la conjugat. Anticorpul conjugat cu aur a fost distribuit pe tampoanele conjugate printr-un striper automat (Matrix 160, Kinematic Automation, Inc., Twain Harte, California, SUA) la o rată de distribuire de 10 μ l/cm. Tampoanele conjugate au fost uscate la 37°C timp de 1 oră, ambalate într-o pungă de folie uscată și depozitate într-o cameră uscată.

Laminarea și tăierea benzilor de testare: Membrana de nitroceluloză stripată cu anticorpul BB7 de test și anticorpul de capră anti-șoarece de control a fost laminată pe un suport de vinil (G&L Precision Die Cutting, San Jose, California, SUA). Un tampon fitil (30250, EMI Specialty Papers, Redding, Connecticut, SUA) a fost plasat pe partea superioară a suportului, suprapunând membrana cu 2 mm. Un tampon de conjugat de 10 mm a fost suprapus pe membrană cu 2 mm. Un tampon de probă (surewick C048 tampon de celuloză, Millipore, Darmstadt, Germania) a fost plasat deasupra tamponului de conjugat cu o suprapunere de 15 mm din partea de jos a cardului de suport. Cardurile asamblate au fost tăiate în fâșii de 4 mm cu ajutorul unui cuțit (CM4000, Biodot, Irvine, California, SUA).

Extragerea tamponelor de testare: Probele de tampon au fost obținute de la locurile de testare cu diferite niveluri de infestare a ploșnițelor de pat, desemnate ca niveluri de 0, 2, 3, 4, 5, 7 și 8, cu nivelul 0 având cel mai scăzut nivel (adică, fără ploșnițe) și 8 cel mai înalt nivel. Tampoanele au fost extrase în 350 μ l de tampon de extracție timp de 15 minute la temperatura camerei într-un tub Eppendorf. Au fost testate trei soluții tampon de extracție: tampon de extracție 1 conține 1X Tris-HCl (pH 7,6), 0,05 % NaN_3 , 0,1 % BSA și 0,1 % Tween-20; tamponul de extracție 2 conținea 1X Tris-HCl (pH 7,6), 0,05 % NaN_3 , 0,1 % BSA și 0,2 % Tween-20; și tamponul de extracție 3 a conținut 1X Tris-HCl (pH 7,6), 0,05 % NaN_3 , 0,25 % BSA și 0,1 % Tween-20. Diluțiile în serie ale extractelor de tampon au fost efectuate de la 1/2 la 1/4096.

Metoda de testare a testului: 70 μ l de tampon de extracție (control negativ) sau probă de tampon de ploșniță de pat în tampon de extracție au fost pipetate pe tamponul de probă. Intensitatea liniei de testare a fost citită la 15 minute cu ochiul.

Rezultate tampon de extracție 1: După cum se arată în FIG. 2-7, toate benzile au prezentat linii de control pozitive pentru legarea anticorpului de capră anti-șoarece la anticorpul BB2 conjugat cu aur. Toate benzile au arătat absența liniilor de testare pentru banda de control negativ în care s-a adăugat tampon de extracție în loc de un tampon probă. FIG. 2 arată doar liniile de control pozitive pentru diluțiile probei de tampon de nivel 0, deoarece antigenul de ploșniță nu a fost prezent. În FIG. 3-7, liniile de control pozitiv sunt liniile superioare și orice linii de test care arată prezența antigenului de ploșniță sunt sub liniile de control pozitiv. Murdărie sau particule insolubile din tampoane au fost prezente în apropierea fundului membranelor pentru benzile de testare de nivel 3, 5, 7 și 8. Proba de tampon de nivel 2 (FIG. 3) a avut linii de testare vizibile de la diluția 1/16 la diluția 1/2. Proba de tampon de nivel 3 (FIG. 4) a avut linii de testare vizibile de la diluția 1/128 la diluția 1/2. Proba de tampon de nivel 4 (FIG. 5) a avut linii de testare vizibile de la diluția 1/1024 la diluția 1/2. Proba de tampon de nivel 7 (FIG. 6) a avut linii de testare vizibile de la diluția 1/4096 la diluția 1/2. Proba de tampon de nivel 8 (FIG. 7) a avut linii de testare vizibile de la diluția 1/2048 la diluția 1/2. Deși observate vizual, unele dintre liniile de testare notate nu sunt ușor evidente pentru anumite diluții din FIG. 3-7 din cauza limitărilor fotografice. Toate liniile de testare au fost fără frotiuri. Intensitatea semnalului la diluție 1/2 din tamponul de nivel 2 a fost aproximativ egală cu cea a diluției 1/32 din tamponul de nivel 3, diluția 1/64 din tamponul de nivel 4, diluția 1/1024 din tamponul 7 și diluția 1/512 din tamponul de nivel 8. Prin urmare, intensitatea semnalului vizibil la diluție 1/2 din tamponul de nivel 2 a fost cea mai slabă, în comparație cu cea a

diluției 1/2 de la nivelul tamponelor 3, 4, 7 și 8. Semnalul diluției 1/2 din tamponul de nivel 8 a fost cel mai puternic.

Intensitățile semnalului au fost, de asemenea, determinate folosind un cititor de benzi de testare Axxin (Axxin, Fairfield, Victoria, Australia) pentru a măsura zonele liniei de testare pentru diferite concentrații (1/2048 până la 1/2) de nivel 0, 2, 3, 4, 7, și 8 probe de tampon extrase în 350 μ l de tampon 1. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 2.

Tabelul 2: Suprafețele liniei de testare din diferite concentrații de probe de tampon (tampon 1)

Concentrație	Suprafețele liniei de testare					
	Nivel 8	Nivel 7	Nivel 4	Nivel 3	Nivel 2	Nivel 0
0	253	397	232	267	237	362
1/2048	654	1187	---	---	---	---
1/1024	1013	1978	359	---	---	---
1/512	1936	3291	443	336	297	---
1/256	3388	5356	681	526	284	---
1/128	5373	7348	990	526	285	---
1/64	7662	10522	840	743	326	327
1/32	9341	11385	3024	1199	310	296
1/16	11420	12550	4609	2095	411	265
1/8	12066	8830	7500	3309	392	433
1/4	9793	7765	7980	6161	574	316
1/2	8693	6279	8550	8516	967	448

Pentru fiecare nivel, a fost obținută o citire pentru tampon ca martor negativ (adică, concentrația "0"). Citirea controlului negativ (Bo) a fost împărțită singură pentru a produce o valoare normalizată de 1. Citirea controlului negativ (Bo) a fost apoi împărțită la aria liniei de testare (B) pentru fiecare diluție în nivel, unde valori mai mici sub 1 sugerează cantități mai mari de antigen de ploșniță de pat și valorile de peste 1 indică absența antigenului de ploșnițe de pat. Datele exprimate ca Bo/B sunt furnizate în Tabelul 3.

Tabelul 3: Bo/B calculat din suprafețele liniei de testare din diferite concentrații de probe de tampon (tampon 1)

Concentrație	BoB					
	Nivel 8	Nivel 7	Nivel 4	Nivel 3	Nivel 2	Nivel 0
0	1	1	1	1	1	1
[1/2048]	0,3869	0,3345	---	---	---	---
[1/1024]	0,2498	0,2007	0,6462	---	---	---
[1/512]	0,1307	0,1206	0,5237	0,7946	0,798	---
[1/256]	0,0747	0,0741	0,3407	0,5076	0,8345	---
[1/128]	0,0471	0,054	0,2343	0,5076	0,8316	---
[1/64]	0,033	0,0377	0,2762	0,3594	0,727	1,107
[1/32]	0,0271	0,0349	0,0767	0,2227	0,7645	1,223
[1/16]	0,0222	0,0316	0,0503	0,1274	0,5766	1,366
[1/8]	0,021	0,045	0,0309	0,0807	0,6046	0,836
[1/4]	0,0258	0,0511	0,0291	0,0433	0,4129	1,146
[1/2]	0,0291	0,0632	0,0271	0,0314	0,2451	0,808

Tabelele 2-3 și FIG. 8A arată, în general, că valorile măsurate ale concentrațiilor din tampoanele de nivel 8 (corespunzând celui mai mare nivel de infestare a ploșnițelor de pat) au fost cele mai mari, iar valorile concentrațiilor de la tampoanele de nivel 2 (corespunzând celui mai mic nivel de infestare a ploșnițelor de pat) au fost cele mai scăzute. Tabelul 2 și FIG. 8B arată că tampoanele de nivel 8 au produs intensități de semnal mai bune decât tampoanele de nivel 2 și 4. Tabelul 3 sugerează că tampoanele de nivel 8 au conținut mai mult antigen de ploșnițe de pat decât alte niveluri.

Rezultate tampon de extracție 2: După cum se arată în FIG. 9-11, toate benzile au arătat linii de control pozitive pentru legarea anticorpului de capră anti-șoarece la anticorpul BB2 conjugat cu aur. Toate benzile au arătat absența liniilor de testare pentru banda de control negativ în care s-a adăugat tampon de extracție în loc de o probă de tampon. În FIG. 9-11, liniile de control pozitiv sunt liniile superioare și orice linii de test care arată prezența antigenului de ploșniță de pat sunt sub liniile de control pozitiv. Murdărie sau particule insolubile din tampoane au fost prezente în apropierea fundului membranelor pentru benzile de testare de nivel 4, 5 și 8. Proba de tampon de nivel 4 (FIG. 9) a avut linii de testare vizibile de la diluția 1/512 la diluția 1/2. Probele de tampon de nivel 5 și 8 (FIG. 10 și, respectiv, 11) au avut linii de testare vizibile de la diluția 1/1024 la diluția 1/2. Deși observate vizual, unele dintre liniile de testare notate nu sunt ușor evidente pentru anumite diluții din FIG. 9-11 din cauza limitărilor fotografice. Toate liniile de testare au fost mănjite. Intensitatea semnalului diluției 1/16 din tamponul de nivel 4 a fost aproximativ egală cu cea a diluției 1/64 din tamponul de nivel 5 și 8. Intensitatea semnalului a fost cea mai slabă pentru tamponul de nivel 4 și similară între tampoanele de nivel 5 și 8.

Intensitățile semnalului au fost, de asemenea, determinate folosind un cititor de benzi de testare Axxin (Axxin, Fairfield, Victoria, Australia) pentru a măsura zonele liniei de testare pentru diferite concentrații (1/2048 până la 1/2) ale probelor de tampon de nivel 4, 5 și 8 extrase în 350 μ l de tampon 2. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 4.

Tabelul 4: Suprafețele liniei de testare din diferite concentrații de probe de tampon (tampon 2)

Concentrație	Suprafețele liniei de testare		
	Nivel 8	Nivel 5	Nivel 4
0	195	230	217
1/2048	365	---	---
1/1024	693	542	356
1/512	961	810	446
1/256	1787	1395	527
1/128	3250	2143	959
1/64	5225	4157	1623
1/32	7927	6696	2692
1/16	9306	9766	4413
1/8	10647	10173	6685
1/4	11489	-	8605
1/2	9818	12250	10150

Datele exprimate ca Bo/B calculate din zonele liniei de testare sunt furnizate în Tabelul 5.

Tabelul 5: Bo/B calculat din suprafețele liniei de testare din diferite concentrații de probe de tampon (tampon 2)

Concentrație	Bo/B		
	Nivel 8	Nivel 5	Nivel 4
0	1	1	1
[1/2048]	0,5342	---	---
[1/1024]	0,2814	0,4244	0,6096
[1/512]	0,2029	0,2840	0,4865

Concentrație	Bo/B		
	Nivel 8	Nivel 5	Nivel 4
[1/256]	0,1091	0,1649	0,4118
[1/128]	0,06	0,1073	0,2263
[1/64]	0,0373	0,0553	0,1337
[1/32]	0,0246	0,0343	0,0806
[1/16]	0,0210	0,0236	0,0492
[1/8]	0,0183	0,0226	0,0325
[1/4]	0,0170	---	0,0252
[1/2]	0,0199	0,0188	0,0214

Tabelele 4-5 și FIG. 12A arată că, în general, valorile măsurate ale tamponelor de nivelul 8 au fost cele mai mari, iar valorile tamponelor de nivelul 4 au fost cele mai scăzute. Deși vizibilitatea liniilor de testare de la tamponele de nivelul 5 a fost similară cu tamponele de nivelul 8 (FIG. 10 și, respectiv, 11), rezultatele cititorului Axxin în Tabelul 4 și FIG. 12A arată că tamponele de nivel 8 au produs intensități de semnal mai bune decât tamponele de nivel 4 și 5. Tabelul 5 sugerează că tamponele de nivelul 8 au conținut mai mult antigen de ploșnițe de pat decât celelalte niveluri.

Rezultate tampon de extracție 3: După cum se arată în FIG. 13-17, toate benzile au arătat linii de control pozitive pentru legarea anticorpului de capră anti-șoarece la anticorpul BB2 conjugat cu aur. Toate benzile au arătat absența liniilor de testare pentru banda de control negativ în care s-a adăugat tampon de extracție în loc de o probă de tampon. În FIG. 13-17, liniile de control pozitiv sunt liniile superioare și orice linii de test care arată prezența antigenului de ploșniță de pat sunt sub liniile de control pozitiv. Murdărie sau particule insolubile din tampon au fost prezente în apropierea fundului membranelor pentru benzile de testare de nivel 3, 5, 7 și 8. Eșantionul de tampon de nivel 2 (neprezentat) a avut linii de testare vizibile de la diluția de 1/8 la diluția de 1/2. Proba de tampon de nivel 3 (FIG. 13) a avut linii de testare vizibile de la diluția 1/128 la diluția 1/2. Proba de tampon de nivel 4 (FIG. 14) a avut linii de testare vizibile de la diluția 1/1024 la diluția 1/2. Proba de tampon de nivel 5 (FIG. 15) a avut linii de testare vizibile de la diluția 1/512 la diluția 1/2. Proba de tampon de nivel 7 (FIG. 16) a avut linii de testare vizibile de la diluția 1/4096 la diluția 1/2. Proba de tampon de nivel 8 (FIG. 17) a avut linii de testare vizibile de la diluția 1/2048 la diluția 1/2. Deși observate vizual, unele dintre liniile de testare notate nu sunt ușor evidente pentru anumite diluții din FIG. 13-17 din cauza limitărilor fotografice. Toate liniile de testare au fost mângjite. Intensitatea semnalului la diluție 1/2 din tamponul de nivel 2 a fost aproximativ egală cu cea a diluției 1/64 din tamponul de nivel 3, diluția 1/64 din tamponul de nivel 4, diluția 1/64 din tampon 5, diluția 1/1024 din tamponul de nivel 7 și diluția 1/512 din tamponul de nivel 8. Prin urmare, intensitatea semnalului vizibil la diluție 1/2 din tamponul de nivel 2 a fost cea mai slabă în comparație cu cea la diluții 1/2 de la celelalte niveluri. Semnalul de diluție 1/2 din tamponul de nivel 8 a fost cel mai puternic.

Intensitățile semnalului au fost, de asemenea, determinate folosind un cititor de benzi de testare Axxin (Axxin, Fairfield, Victoria, Australia) pentru a măsura zonele liniei de testare pentru diferite concentrații (1/2048 până la 1/2) ale probelor de tampon de nivel 4, 5 și 8 extrase în 350 μ l de tampon 3. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 6.

Tabelul 6: Suprafețele liniei de testare din diferite concentrații de probe de tampon (tampon 3)

Concentrație	Suprafețele liniei de testare					
	Nivel 8	Nivel 7	Nivel 5	Nivel 4	Nivel 3	Nivel 2
0	441	283	263	225	170	231
1/2048	735	781	---	---	---	---
1/1024	798	1037	270	334	---	---
1/512	1414	2003	385	574	309	261
1/256	2691	2998	422	1090	403	261
1/128	4741	4665	1026	1439	522	285
1/64	7173	6912	2013	2403	724	276

Concentrație	Suprafețele liniei de testare					
	Nivel 8	Nivel 7	Nivel 5	Nivel 4	Nivel 3	Nivel 2
1/32	9603	8746	5763	4090	1360	269
1/16	10377	9626	5743	5842	2430	271
1/8	11788	11767	7021	8061	3462	340
1/4	10725	8466	7120	9518	5189	406
1/2	8584	6803	9408	10413	6098	752

Datele exprimate ca Bo/B calculate din zonele liniei de testare sunt furnizate în Tabelul 7.

Tabelul 7: Bo/B calculat din suprafețele liniei de testare din diferite concentrații de probe de tampon (tampon 3)

Concentrație	BoB					
	Nivel 8	Nivel 7	Nivel 5	Nivel 4	Nivel 3	Nivel 2
0	1	1	1	1	1	1
[1/2048]	0,6	0,3624	---	---	---	---
[1/1024]	0,5526	0,2729	0,9741	0,6737	---	---
[1/512]	0,3119	0,1413	0,6831	0,3920	0,5502	0,8851
[1/256]	0,1639	0,0944	0,6232	0,2064	0,4218	0,8851
[1/128]	0,0930	0,0607	0,2563	0,1564	0,3257	0,8105
[1/64]	0,0615	0,0409	0,1307	0,0936	0,2348	0,8370
[1/32]	0,0459	0,0324	0,0456	0,0550	0,1250	0,8587
[1/16]	0,0425	0,0294	0,0458	0,0385	0,0700	0,8524
[1/8]	0,0374	0,0241	0,0375	0,0279	0,0491	0,6794
[1/4]	0,0411	0,0334	0,0369	0,0236	0,0328	0,5690
[1/2]	0,0514	0,0416	0,0280	0,0216	0,0279	0,3072

Tabelele 6-7 și FIG. 18A arată că, în general, valorile măsurate ale tamponelor de nivelul 8 au fost cele mai mari, iar valorile tamponelor de nivelul 2 au fost cele mai scăzute. Tabelul 7 și FIG. 18A arată că tamponul de nivel 8 a produs intensități de semnal mai bune decât celelalte niveluri.

Compararea tamponelor de extracție: Pentru tamponul de extracție 1, toate liniile de testare au fost clare și nu au avut pete, în timp ce tamponul de extracție 2 și 3 au dus la linii de test pătate. Pentru tamponul de nivel 4, extracția cu tamponul 1 și 3 a dus la semnale care încep la diluția 1/1024, dar extracția cu tamponul 2 a dus la semnale care încep la diluția 1/512. Cu toate acestea, extracția nivelului 5 cu tamponul 2 a dat semnal la o concentrație mai mică (diluție 1/1024) decât extracția cu tamponul 3 (diluție 1/512). Tamponul 1 și 3 au dat semnale la aceeași concentrație pentru tamponul de nivel 3 și 7. Cu toate acestea, extracția tamponelor de nivel 2 cu tampon 1 a dus la un semnal la o concentrație mai mică (diluție 1/16) decât extracția cu tampon 3 (diluție 1/8). În general, valorile măsurate ale tuturor tamponelor la nivel de testare au fost mai mari pentru extracția cu tamponul 1 decât pentru tamponul 2 și 3.

Precizia studiului utilizând cititorul Axxin: Au fost preparate nouă replici ale tamponului de extracție 1 ca martor negativ și nouă replici la fiecare dintre diluțiile 1/2048, 1/512 și 1/128 ale tamponelor de nivel 7 extrase cu tamponul 1 și au fost măsurate zonele liniei de testare folosind o bandă de testare Axxin cititor (Axxin, Fairfield, Victoria, Australia). Zonele liniei de testare sunt prezentate în Tabelul 8 și FIG. 20.

Tabelul 8: Rezultatele studiului de precizie ale zonelor replicate ale liniilor de testare

	Suprafețele liniei de testare			
Proces	Tampon 1	Nivel 7 1/2048	Nivel 7 1/512	Nivel 7 1/128
1	250	1415	3299	6163

	Suprafețele liniei de testare			
Proces	Tampon 1	Nivel 7 1/2048	Nivel 7 1/512	Nivel 7 1/128
2	251	1426	2794	6276
3	233	1293	2684	7305
4	289	1238	2810	8079
5	260	1202	2531	8090
6	271	1075	2401	6583
7	260	1283	2260	9109
8	218	1540	2660	8297
9	194	1444	2773	5997
Medie	247,3	1324,0	2690,2	7322,1
STDEV	28,6	144,3	295,3	1120,6
% CV	11,6	10,9	11,0	15,3

Coeficientul procentual de variație (% CV) a fost mai mic de 20%, ceea ce este un bun % CV pentru măsurătorile Axxin.

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- WO-A1-2013/130613
- WO-A1-2017/037126
- WO-A1-2017/070594
- US-A1- 2010 233 731
- US-A1- 2015 064 727
- US-B1- 7 129 053
- US-B2- 7 482 128

(57) Revendicări:

1. Anticorp monoclonal anti-insectă de pat produs de: (a) un hibridom depus la American Type Culture Collection (ATCC) cu numărul de acces PTA-122644 [BB2], sau un fragment al acestuia de legare la antigen, sau (b) un hibridom depus la ATCC sub Numărul de acces PTA-122645 [BB7] sau un fragment de legare la antigen al acestuia.

2. Anticorp monoclonal conjugat sau fragment de legare a antigenului conjugat, cuprinzând anticorpul monoclonal anti-insecte de pat sau fragmentul de legare la antigen conform revendicării 1 și un agent de detectare.

3. Anticorpul monoclonal conjugat sau fragmentul de legare a antigenului conjugat conform revendicării 2, în care agentul de detectare este o etichetă enzimatică, o etichetă radioactivă, un fluorofor, un cromofor, un agent de imagistică, un metal, un ion metalic, aur coloidal sau nanoparticule de aur.

4. Anticorpul conjugat sau fragmentul conjugat de legare la antigen conform revendicării 2 sau 3, cuprinzând anticorpul monoclonal anti-insectă de pat produs de hibridomul depus la ATCC sub Numărul de acces PTA-122644 [BB2] sau un fragment de legare la antigen al acestuia.

5. Anticorpul conjugat sau fragmentul conjugat de legare la antigen conform revendicării 2 sau 3, cuprinzând anticorpul monoclonal anti-insectă de pat produs de hibridomul depus la ATCC sub Numărul de acces PTA-122645 [BB7] sau un fragment de legare la antigen al acestuia.

6. Compoziție cuprinzând anticorpus monoclonal anti-insectă de pat sau fragmentul de legare la antigen din revendicarea 1, anticorpus conjugat sau fragmentul de legare la antigenul conjugat din oricare dintre revendicările 2 până la 5, sau o combinație a acestora.

7. Compoziție conform revendicării 6, cuprinzând:

(a)(1) anticorpus monoclonal anti-insectă de pat conform revendicării 1 produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122644 [BB2] și

(2) anticorpus monoclonal anti-insectă de pat conform revendicării 1 produs de hibridomul depus la ATCC sub Numărul de Acces PTA-122645 [BB7] sau anticorpus conjugat conform revendicării 5; sau

(b)(1) anticorpus monoclonal anti-insectă de pat conform revendicării 1 produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122645 [BB7] și

(2) anticorpus conjugat conform revendicării 4.

8. Trusă cuprinzând anticorpus monoclonal anti-insecte de pat sau fragmentul de legare a antigenului din revendicarea 1, anticorpus conjugat sau fragmentul de legare a antigenului conjugat din oricare dintre revendicările de la 2 până la 5, compoziția din revendicarea 6 sau 7 sau o combinație a acestora.

9. Un hibridom capabil să producă un anticorpus monoclonal anti-insectă de pat, în care hibridomul este depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122644 [BB2] sau numărul de acces PTA-122645 [BB7].

10. Celulă izolată care produce anticorpus monoclonal anti-insectă de pat sau fragmentul de legare la antigen din revendicarea 1.

11. Metodă de producere a anticorpului monoclonal anti-insectă de pat sau a fragmentului de legare a antigenului din revendicarea 1, cuprinzând (a) cultivarea celulei din revendicarea 10 și (b) izolarea anticorpului monoclonal anti-insectă de pat sau a fragmentului de legare la antigen din celula de cultură.

12. Metodă de detectare a insectelor de pat, care cuprinde punerea în contact a unei probe care cuprinde un antigen de ploșnițe de pat cu anticorpus monoclonal anti-ploșnițe sau fragmentul de legare a antigenului din revendicarea 1, anticorpus conjugat sau fragmentul de legare la antigenul conjugat din oricare dintre revendicările 2 până la 5, compoziția din revendicarea 6 sau 7, sau o combinație a acestora și detectarea legării antigenului ploșniței de pat la anticorpus monoclonal anti-ploșniță de pat sau fragmentul de legare la antigen, anticorpus conjugat sau fragmentul de legare la antigenul conjugat, compoziția sau combinația acestora, de preferință în care detectarea cuprinde efectuarea unui test de curgere laterală.

13. Metodă conform revendicării 12, în care proba este pusă în contact cu un anticorpus monoclonal anti-insectă de pat din revendicarea 1 și un anticorpus conjugat din oricare dintre revendicările de la 2 până la 5.

14. Metodă conform revendicării 13, în care:

(a) anticorpus monoclonal anti-insectă de pat este anticorpus monoclonal anti-ploșniță de pat din revendicarea 1 produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122644 [BB2], și anticorpus conjugat este anticorpus conjugat din revendicarea 5, sau

(b) anticorpus monoclonal anti-insectă de pat este anticorpus monoclonal anti-ploșniță de pat din revendicarea 1 produs de hibridomul depus la ATCC sub numărul de acces PTA-122645 [BB7], și anticorpus conjugat este anticorpus conjugat din revendicarea 4.

15. Metodă conform oricăreia dintre revendicările de la 12 până la 14, în care metoda mai cuprinde colectarea probei care cuprinde antigenul de ploșniță de pat cu un dispozitiv de colectare și extragerea antigenelor din probă.

16. Metodă conform revendicării 15, în care dispozitivul de colectare este un tampon.

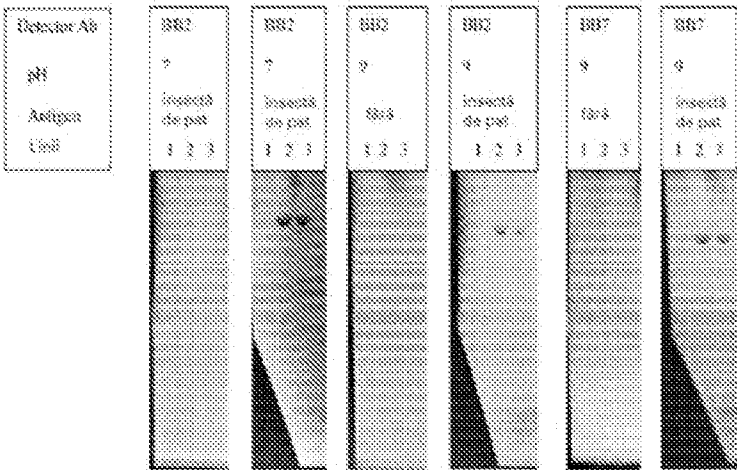


FIG. 1

Nivelul 0 Probe de tampon (fără insecte de pat) extrasă în 350 ul tampon de extracție 1

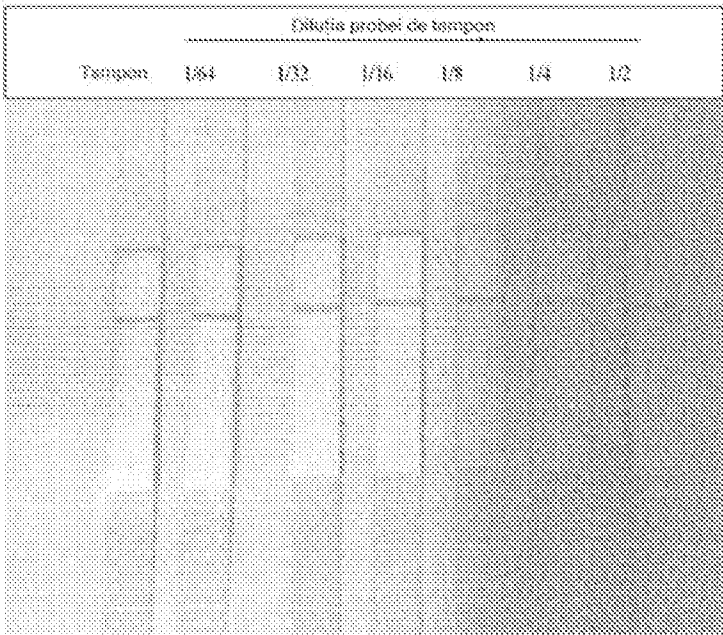


FIG. 2

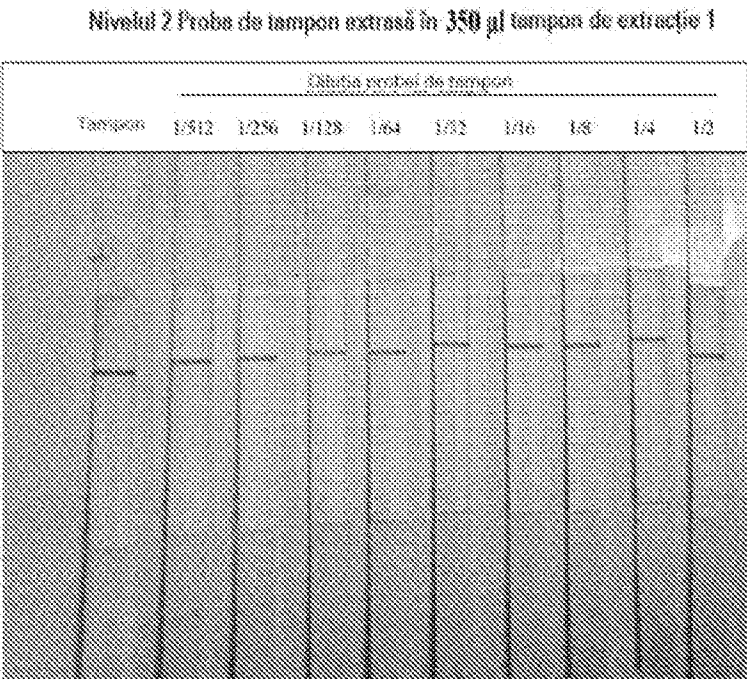


FIG. 3

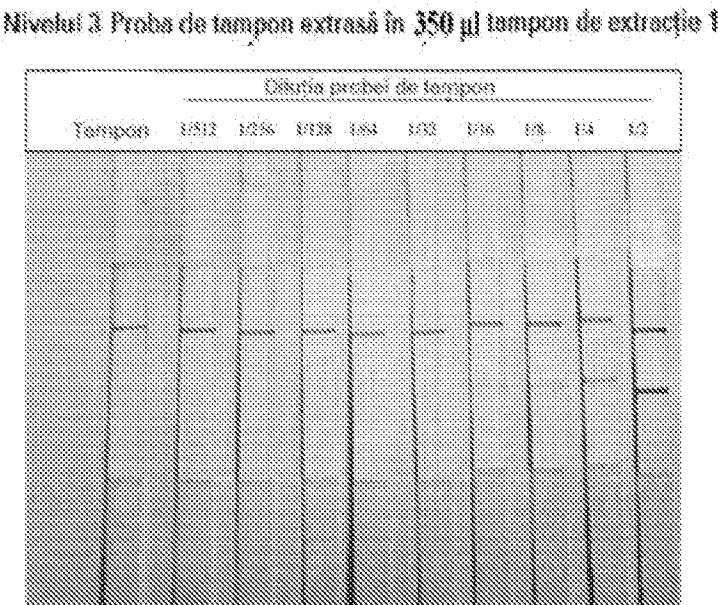


FIG. 4

Nivelul 4 Proba de tampon extrasă în 350 μ l tampon de extracție 1

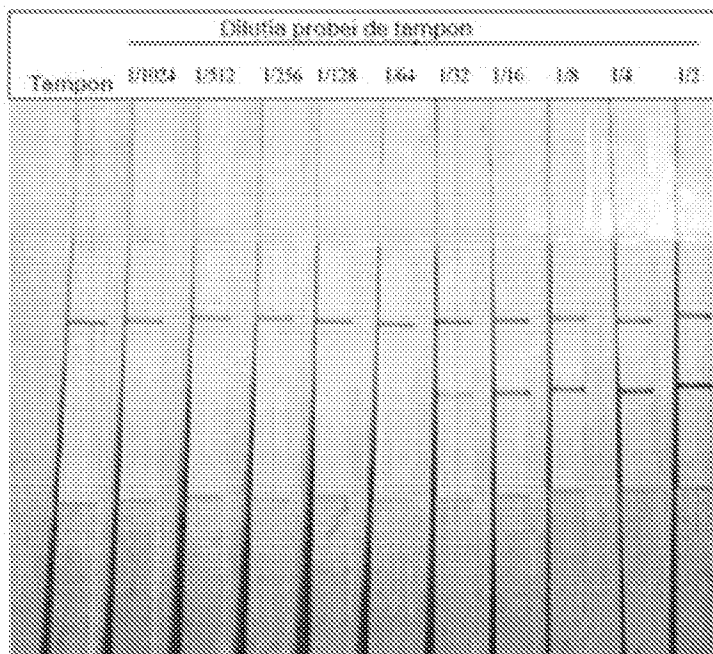


FIG. 5

Nivelul 7 Proba de tampon extrasă în 350 μ l tampon de extracție 1

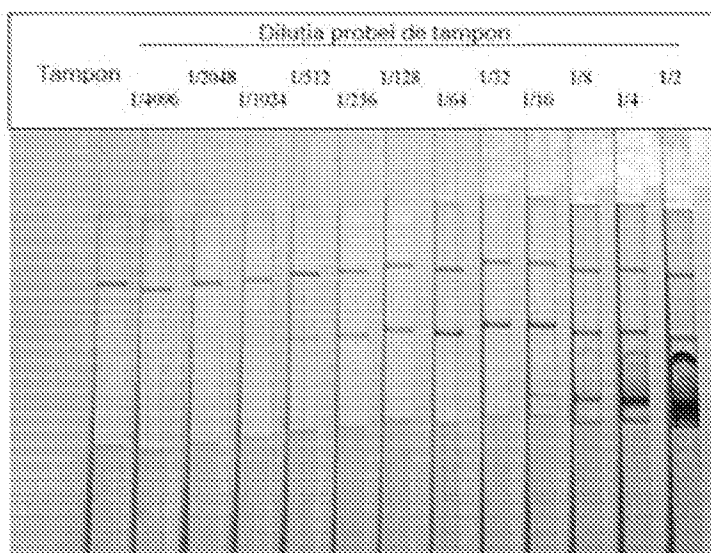


FIG. 6

Nivelul 8 Proba de tampon extrasă în 350 µl tampon de extracție 1

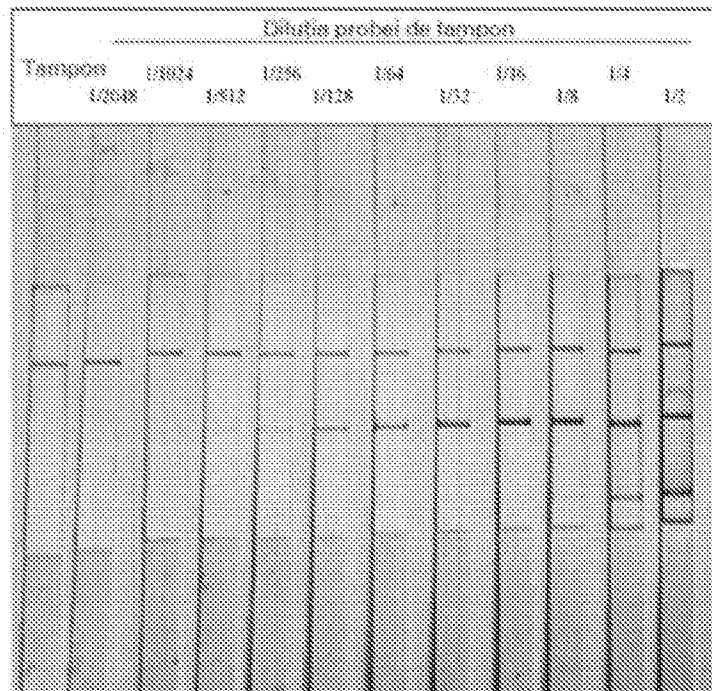


FIG. 7

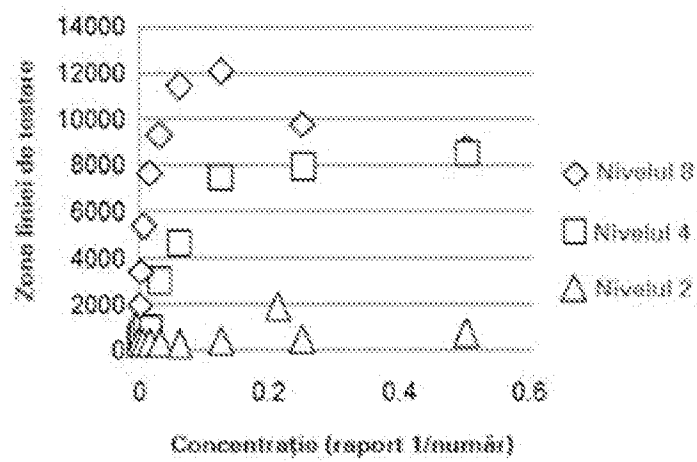


FIG. 8A

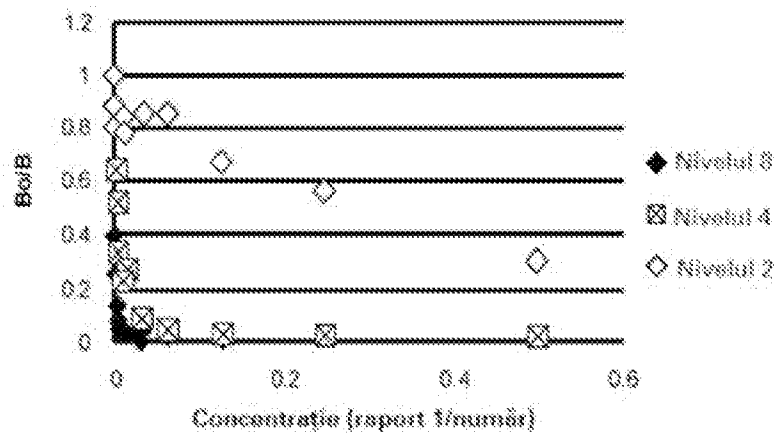


FIG. 8B

Nivelul 4 Proba de tampon extrasă în 350 µl tampon de extracție 2

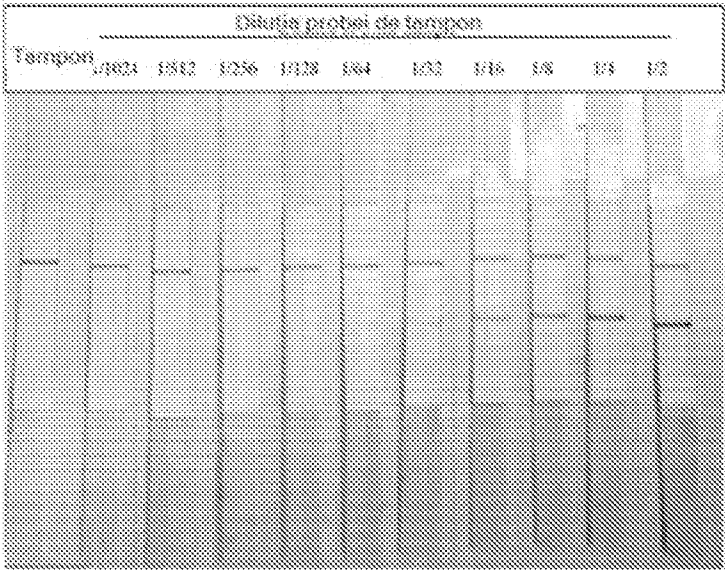


FIG. 9

Nivelul 5 Proba de tampon extrasă în 350 µl tampon de extracție 2

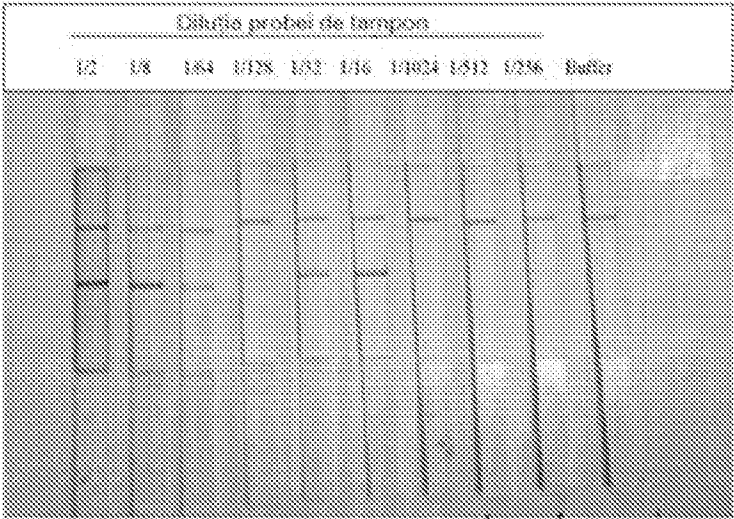


FIG. 10

Nivelul 8 Proba de tamponi extrasă în 350 µl tampon de extracție 2

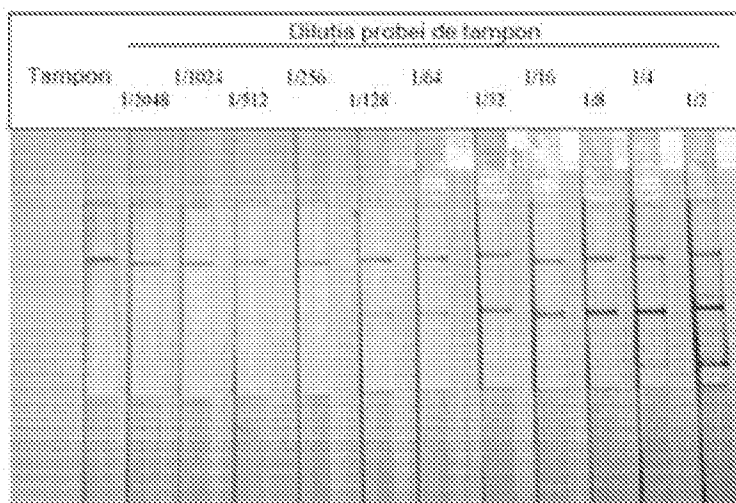


FIG. 11

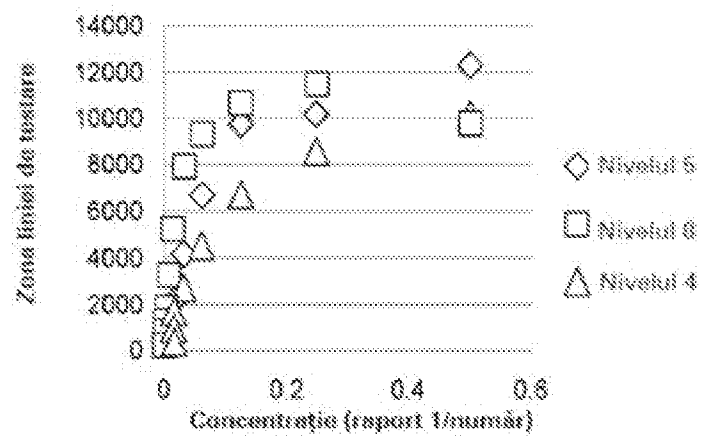


FIG. 12A

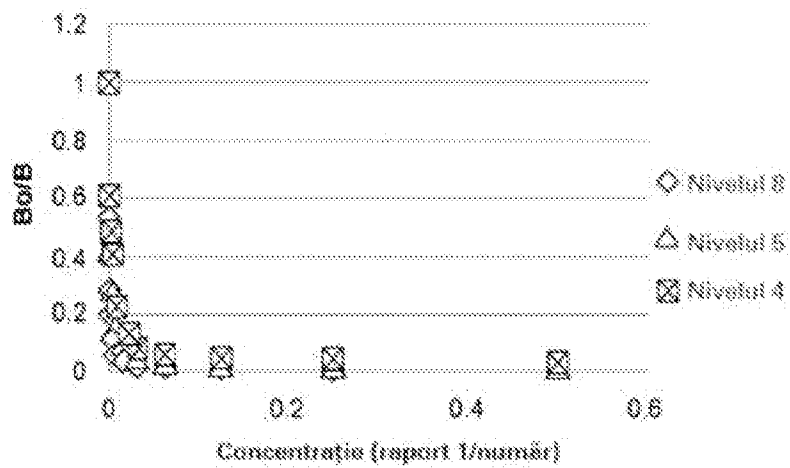


FIG. 12B

Nivelul 3 Proba de tampon extrasă în 350 µl tampon de extracție 3

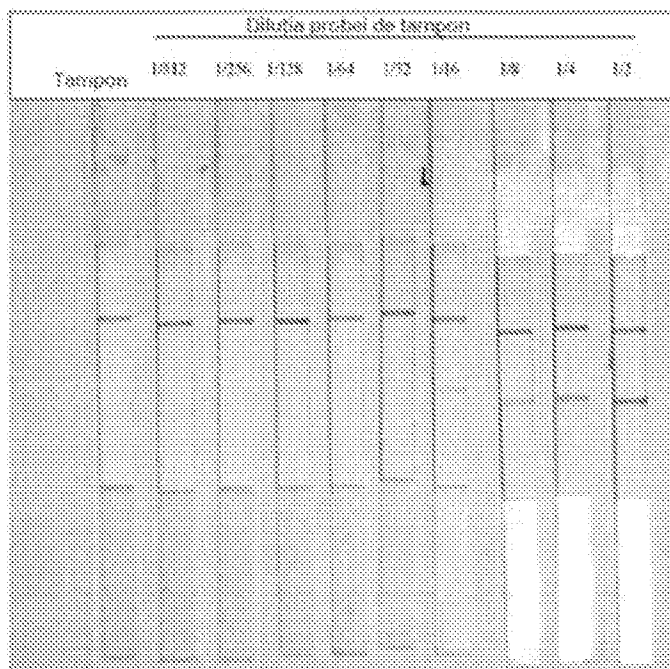


FIG. 13

Nivelul 4 Proba de tampon extrasă în 350 µl tampon de extracție 3

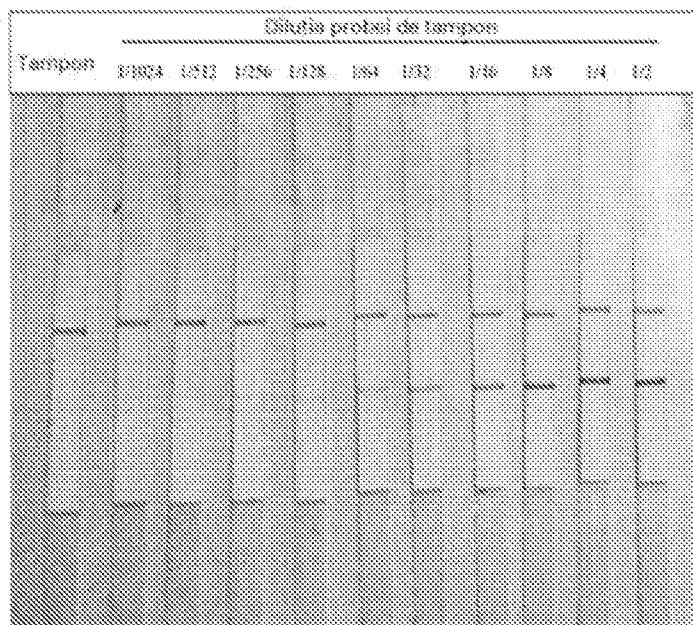


FIG. 14

Nivelul 5 Proba de tampon extrasă în 350 µl tampon de extracție 3

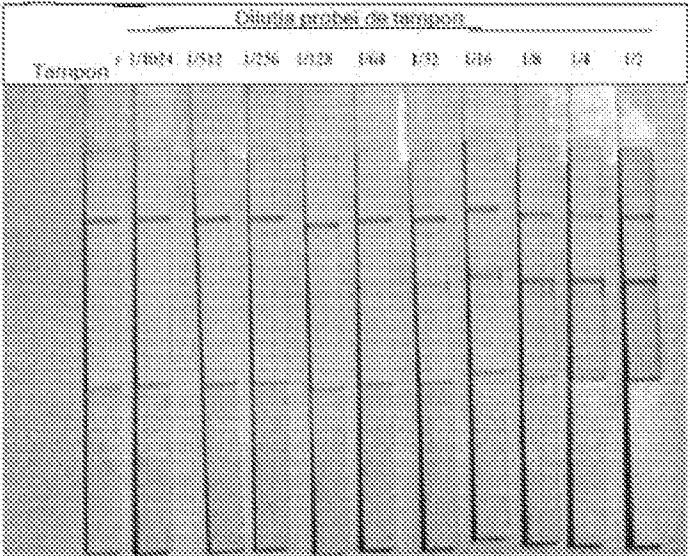


FIG. 15

Nivelul 7 Proba de tampon extrasă în 350 µl tampon de extracție 3

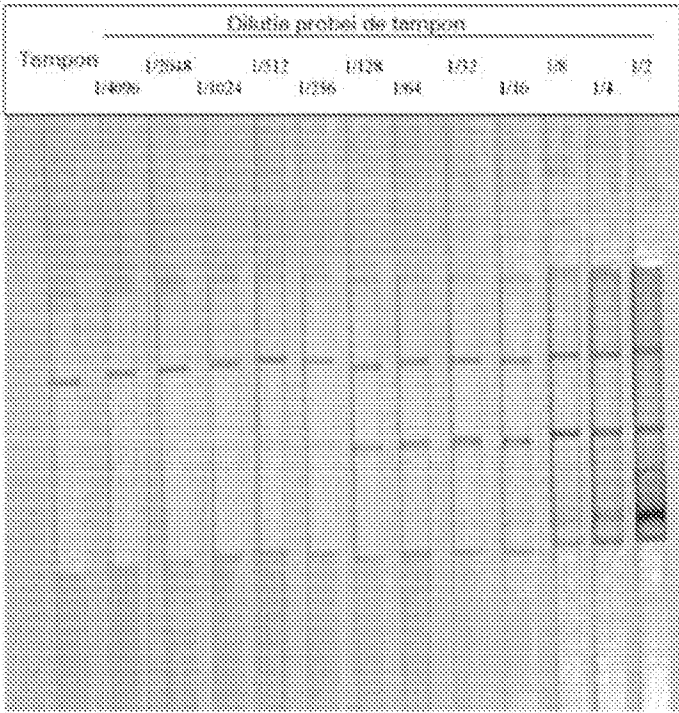


FIG. 16

Nivelul 8 Proba de tampon extrasă în 350 µl tampon de extracție 3

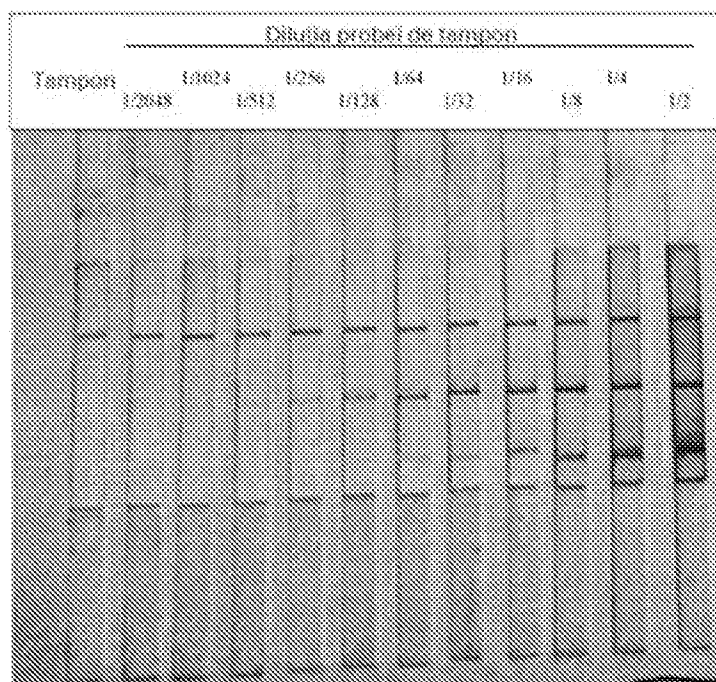


FIG. 17

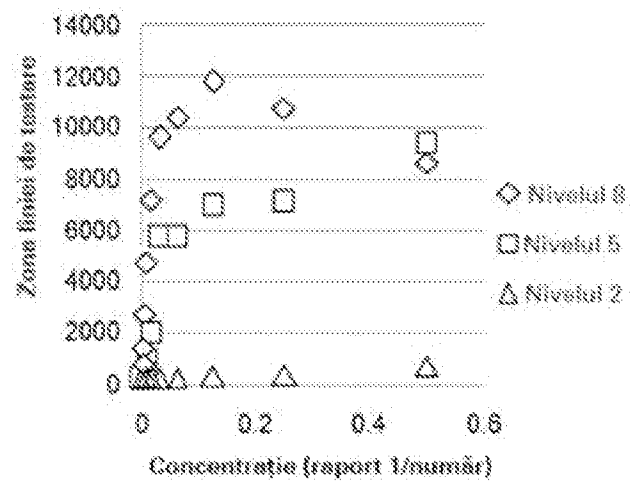


FIG. 18A

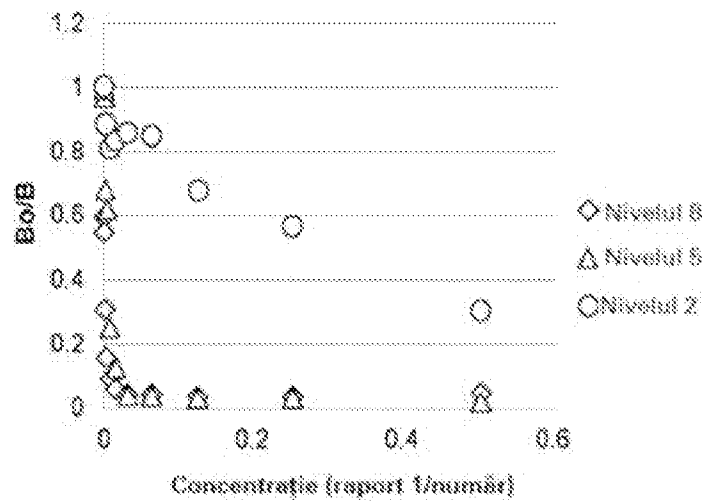


FIG. 18B

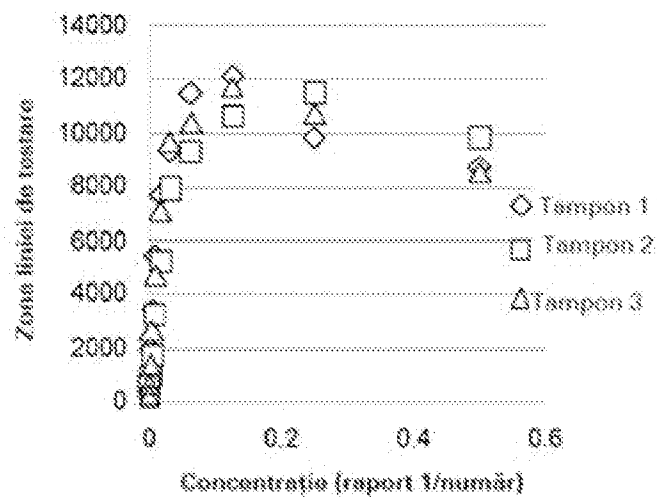


FIG. 19A

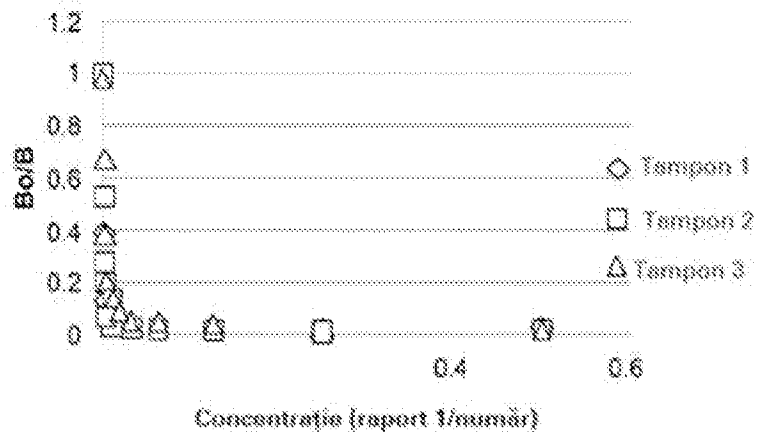


FIG. 19B

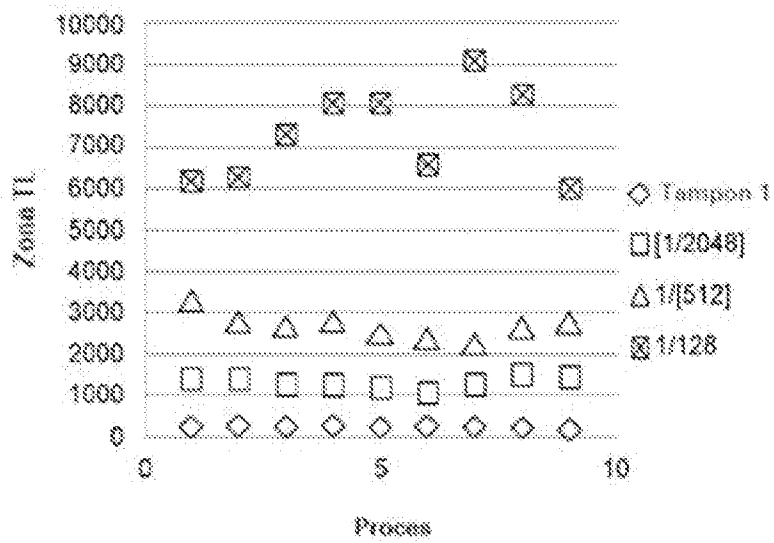


FIG. 20