

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 865 500**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.10.2016** **PCT/JP2016/080369**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.04.2017** **WO17065213**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2016** **E 16855466 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2021** **EP 3364189**

54 Título: **Pieza de prueba inmunocromatográfica**

30 Prioridad:

16.10.2015 JP 2015204680

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

15.10.2021

73 Titular/es:

TOYOBO CO., LTD. (100.0%)
2-8 Dojima Hama 2-chome Kita-ku Osaka-shi
Osaka 530-8230, JP

72 Inventor/es:

KAWAMINAMI, HIROSHI;
TSUJI, YUJI y
YONEDA, KEIZO

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 865 500 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

Pieza de prueba inmunocromatográfica

5 La presente invención se refiere a una pieza de prueba inmunocromatográfica para cuantificar un analito en una muestra biológica, a un método para cuantificar un analito en una muestra biológica utilizando la pieza de prueba inmunocromatográfica, a un kit de análisis inmunocromatográfico que comprende la pieza de prueba inmunocromatográfica y a un método para producir la pieza de prueba inmunocromatográfica.

10 La inmunocromatografía es un inmunoensayo que comprende preparar un soporte poroso sobre el que se inmoviliza un anticuerpo que se une específicamente a un analito, y revelar una muestra biológica desde una parte terminal del soporte poroso, permitiendo simultáneamente que la muestra biológica migre en el soporte poroso por acción capilar, tiempo durante el que el analito se marca y se une al anticuerpo por una respuesta inmunitaria, de manera que el analito se acumula con el tiempo y se produce localmente el revelado de color, determinando de esta manera la presencia o ausencia del analito en la muestra biológica.

15 Las ventajas de la inmunocromatografía son, por ejemplo, que resulta fácil de hacer funcionar y es visualmente evaluable. Los diagnósticos *in vitro* que utilizan dichas ventajas, tales como los agentes de ensayo del embarazo y los agentes diagnósticos de la gripe, han sido ampliamente utilizados en todo el mundo y han atraído interés como POCT (pruebas en el lugar de asistencia) (literatura de patentes (LTP) nº 1).

20 Las POCT se refieren a pruebas clínicas que lleva a cabo un proveedor de atención médica junto al paciente. Al contrario que las pruebas clínicas realizadas en laboratorios centrales en hospitales grandes o similares, los resultados de ensayo de las POCT pueden obtenerse instantáneamente en el acto. De acuerdo con lo anterior, se está incrementando la necesidad de las mismas en el contexto médico.

25 La inmunocromatografía convencional habitualmente es una evaluación visual (evaluación cualitativa). Sin embargo, en los últimos años, mediante la utilización de lectores cromatográficos o dispositivos similares para medir la intensidad de revelado del color, se están desarrollando técnicas para cuantificar la concentración de un analito en una muestra biológica.

30 Una técnica representativa de dicha cuantificación es el método de tipo sándwich. El método de tipo sándwich utiliza dos tipos de anticuerpo para diferentes epítomos de un analito. El primer anticuerpo se utiliza como reactivo de detección sensibilizado con partículas de detección, tales como coloide de oro, látex de color o partículas fluorescentes. El segundo anticuerpo se utiliza como anticuerpo de captura inmovilizado sobre una parte terminal de un soporte poroso para llevar a cabo una medición de línea de ensayo. Además, se inmoviliza un anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo de detección en la parte del otro extremo del soporte poroso, y se utiliza para una medición de línea de control. El analito contenido en la muestra biológica se revela desde un extremo del soporte poroso y migra, formando simultáneamente un complejo inmunitario con el anticuerpo de detección. El complejo inmunitario entra en contacto y es capturado por un anticuerpo de captura en la línea de ensayo, de manera que la línea de ensayo adquiere color. El reactivo de detección libre que no ha formado un complejo inmunitario con el analito pasa la línea de ensayo y es capturado por un anticuerpo en la línea de control, de manera que la línea de control adquiere color. Puede determinarse la concentración del analito mediante la medición de la intensidad de revelado de color en dichas líneas utilizando un dispositivo, tal como un lector cromatográfico.

35 La inmunocromatografía convencional utiliza el mismo reactivo de detección para la detección de la línea de ensayo y la detección de la línea de control. Lo anterior causa el problema de que la intensidad de revelado de color en la línea de control varía debido a la influencia de la concentración de analito. Específicamente, aparece el problema siguiente. En el caso de que el analito se encuentre presente a una concentración elevada en una muestra biológica, una gran cantidad de partículas de detección forma un complejo inmunitario con el analito y el complejo inmunitario resulta capturado en la línea de ensayo aguas arriba; de acuerdo con lo anterior, la intensidad de revelado de color en la línea de ensayo es alta. Por otra parte, debido a que se reduce la cantidad de reactivo de detección libre, la intensidad de revelado de color en la línea de control es baja. En el caso de que un analito se encuentre presente a una baja concentración en una muestra biológica, una pequeña cantidad de partículas de detección forma un complejo inmunitario con el analito y resulta capturada una gran cantidad de partículas de detección libres en la línea de control. Como resultado, la intensidad de revelado de color en la línea de control es alta.

40 En la cuantificación de la inmunocromatografía, la línea de control puede utilizarse para medir la cantidad de reactivo de detección que fluye hacia el interior del soporte poroso. Por lo tanto, en el caso de que se revele una cantidad específica de reactivo de detección en un soporte poroso, la intensidad de revelado de color es deseablemente constante en todo momento. Si el revelado de la intensidad del color en la línea de control varía debido a la influencia de la concentración de analito tal como se ha indicado anteriormente, podría afectar gravemente a la precisión de la medición.

Literatura de patentes

LTP nº 1: JP2006-67979A.

- 5 El documento EP 2.853.894 A1 describe kits diagnósticos y métodos de inmunoensayo para el diagnóstico y la diferenciación del virus de la fiebre porcina africana (VFPA) y el virus de la fiebre porcina clásica (VFPC).

10 El documento US 2013/164858 A1 describe un dispositivo para la detección de un analito en una muestra líquida depositada sobre una primera parte del dispositivo para el transporte a una segunda parte del dispositivo que se encuentra en contacto de fluidos con la primera parte.

L. G. Lee et al., Biosensors 3(4):360-373, 2013, describen un sistema de alto rendimiento de bajo coste para ensayos de flujo lateral de fluorescencia.

- 15 En la base de datos de la técnica anterior IP.com, se describen ensayos de flujo lateral que incluyen pigmentos fluorescentes.

20 El documento US 2013/244314 A1 describe una tira de ensayo inmunocromatográfica y un método de fabricación de la misma.

El documento CN 203 732 547 U describe un papel de ensayo de oro coloidal para la detección rápida y cuantitativa de la galectina-3 (gal-3).

25 A partir del problema indicado anteriormente, un objetivo de la presente invención es proporcionar una pieza de prueba inmunocromatográfica para cuantificar un analito en una muestra biológica, en la que un reactivo de detección de línea de control como reactivo de detección no resulta afectado por la concentración del analito que debe detectarse de manera que puede proporcionarse un método de análisis inmunocromatográfico de precisión más alta que los métodos convencionales, proporcionando un método de cuantificación de un analito en una muestra biológica utilizando la pieza de prueba inmunocromatográfica, proporcionando un kit de análisis inmunocromatográfico que comprende la pieza de prueba inmunocromatográfica y proporcionando un método para producir la pieza de prueba inmunocromatográfica.

35 En el contexto de la presente invención se ha llevado a cabo una investigación exhaustiva para conseguir el objetivo anteriormente indicado. Como resultado, en el contexto de la presente invención se ha descubierto que, en el caso de que un reactivo de detección que comprenda un reactivo de detección de línea de control se utilice a modo de reactivo de detección para la detección de una línea de control, la intensidad de revelado del color en la línea de control puede hacerse más constante sin resultar afectada por la concentración del analito en la muestra biológica. En el contexto de la presente invención se ha realizado una investigación adicional basándose en este resultado y se ha llevado a cabo la presente invención, que es una pieza de prueba inmunocromatográfica que comprende el reactivo de detección de línea de control, un método para cuantificar un analito en una muestra biológica utilizando la pieza de prueba inmunocromatográfica, un kit de análisis inmunocromatográfico que comprende la pieza de prueba inmunocromatográfica y un método para producir la pieza de prueba inmunocromatográfica.

45 Específicamente, la presente invención es tal como sigue.

- (1) Una pieza de prueba inmunocromatográfica para cuantificar un analito en una muestra biológica, comprendiendo la pieza de prueba inmunocromatográfica:

- 50 a) una almohadilla de conjugación impregnada con un reactivo de detección que se une específicamente al analito y un reactivo de detección de línea de control, y
- b) una almohadilla de membrana porosa sobre la que un anticuerpo para la captura del analito se inmoviliza aguas arriba, y un anticuerpo para capturar específicamente el reactivo de detección de línea de control se inmoviliza aguas abajo,
- 55

en el que el reactivo de detección de línea de control comprende partículas de detección que presentan una proteína marcada con biotina unida a las mismas, y en el que la proteína es una proteína derivada de un microorganismo y la proteína derivada del microorganismo es un fragmento peptídico bloqueante.

- 60 (2) La pieza de prueba inmunocromatográfica según (1), en la que el anticuerpo para capturar específicamente el reactivo de detección de línea de control es un anticuerpo antibiotina.

- 65 (3) Un método para cuantificar un analito en una muestra biológica, comprendiendo el método la utilización de la pieza de prueba inmunocromatográfica según (1) o (2).

(4) Un kit de análisis inmunocromatográfico que comprende la pieza de prueba inmunocromatográfica según (1) o (2), un diluyente de muestra y un dispositivo analizador.

(5) Un método para producir la pieza de prueba inmunocromatográfica según (1) o (2).

Según la presente invención, la intensidad de revelado del color en la línea de control puede hacerse más constante sin variar según la concentración del analito en la muestra biológica. Por lo tanto, puede proporcionarse una pieza de prueba inmunocromatográfica de elevada precisión de medición.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una vista superior de un ejemplo de la pieza de prueba inmunocromatográfica de la presente invención.

La figura 2 es una vista lateral del ejemplo de la pieza de prueba inmunocromatográfica de la presente invención.

La figura 3 es una fotografía de los resultados obtenidos mediante medición de la gonadotropina coriónica humana (GCh) utilizando la pieza de prueba inmunocromatográfica de la presente invención.

La figura 4 representa la linealidad de dilución en los resultados de medición de la gonadotropina coriónica humana (GCh) utilizando la pieza de prueba inmunocromatográfica de la presente invención.

La figura 5 es una fotografía de los resultados obtenidos mediante la medición de la gonadotropina coriónica humana (GCh) utilizando unas piezas de ensayos inmunocromatográficas convencionales.

La figura 6 muestra la linealidad de dilución en los resultados de medición de la gonadotropina coriónica humana (GCh) utilizando piezas de ensayos inmunocromatográficas convencionales.

A continuación en la presente memoria se describe la pieza de prueba inmunocromatográfica de la presente invención. La pieza de prueba inmunocromatográfica de la presente invención comprende un reactivo de detección que se une específicamente a un analito y un reactivo de detección de línea de control.

Reactivo de detección de línea de control

El reactivo de detección de línea de control utilizado en la presente invención comprende partículas de detección que presentan una proteína marcada con biotina unida a las mismas. El método de marcaje con biotina no se encuentra particularmente limitado. Por ejemplo, puede utilizarse un método de unión que utiliza el método de N-hidroxisuccinimida. Entre los ejemplos de partículas de detección se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, coloide de oro, partículas de látex, partículas fluorescentes y similares. El método de unión de una proteína marcada con biotina y partículas de detección no se encuentra particularmente limitado. Por ejemplo, puede utilizarse la adsorción física mediante enlaces hidrofóbicos o la conjugación mediante enlaces covalentes.

Proteína

El tipo de proteína utilizado como proteína marcada con biotina es una proteína derivada de un microorganismo y la proteína derivada del microorganismo es un fragmento peptídico bloqueante. La proteína que debe utilizarse puede ser un producto disponible comercialmente, o de otro modo producida mediante métodos conocidos. El tamaño molecular no se encuentra particularmente limitado. La proteína preferentemente presenta un peso molecular medio de 100 kDa o inferior. En general, a medida que se reduce el tamaño molecular de una proteína, se incrementa la cantidad de proteína unida por partícula en las partículas de detección, lo que conduce a un rendimiento elevado, tal como sensibilidad.

Partículas de detección

El tipo de partículas de detección no se encuentra particularmente limitado. Por ejemplo, pueden utilizarse partículas colorantes o partículas fluorescentes. Entre los ejemplos de partículas colorantes se incluyen partículas metálicas y partículas de látex. Entre los ejemplos de partículas metálicas se incluyen coloide de oro, coloide de plata, coloide de platino y similares. El tamaño de partícula de las partículas metálicas no se encuentra particularmente limitado y es preferentemente de entre 1 y 100 nm, más preferentemente de entre 20 y 80 nm, y todavía más preferentemente de entre 40 y 60 nm. Entre los ejemplos de partículas de látex se incluyen partículas de poliestireno, metacrilato de polimetilo, polímeros de ácido acrílico o materiales similares. El tamaño de partícula de las partículas de látex no se encuentra particularmente limitado y es preferentemente de entre 25 y 500 nm, más preferentemente de entre 50 y 250 nm, y todavía más preferentemente de entre 80 y 200 nm. Entre los ejemplos de partículas fluorescentes se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, partículas de poliestireno, metacrilato de polimetilo, polivinil-tolueno, sílice o materiales similares. Entre los ejemplos de pigmentos fluorescentes se

incluyen, aunque sin limitarse a ellos, FITC (isotiocianato de fluoresceína), derivados de rodamina B, hidroxycoumarina y similares. De entre ellos, preferentemente se utiliza coloide de oro y partículas de látex, que son versátiles y altamente visibles.

5 Método de N-hidroxisuccinimida

El método de marcaje con biotina para una proteína marcada con biotina no se encuentra particularmente limitado. Por ejemplo, puede utilizarse el método de N-hidroxisuccinimida. En el caso de que se utilice el método de N-hidroxisuccinimida, el grupo carboxilo de la biotina se somete a una reacción de condensación con un compuesto de N-hidroxiamina en presencia de un agente de condensación por deshidratación y se activa selectivamente para marcar la proteína mediante un enlace amida con un grupo amino de la proteína.

Compuesto de N-hidroxiamina

El compuesto de N-hidroxiamina utilizado en la reacción de condensación no se encuentra particularmente limitado. Entre los ejemplos de compuestos de N-hidroxiamina se incluyen N-hidroxisuccinimida, imida de ácido N-hidroxinorbornén-2,3-dicarboxílico, etil-éster de ácido 2-hidroxiimino-2-cianoacético, 2-hidroxiimino-2-cianoacetamida, N-hidroxipiperidina, N-hidroxiitalimida, N-hidroxiimidazol, N-hidroxiimaleimida y similares. Estos compuestos pueden utilizarse individualmente o en una combinación de dos o más. Entre ellos, resulta preferida la N-hidroxisuccinimida (en adelante en la presente memoria en ocasiones denominado NHS), debido a que resulta relativamente económico y se encuentra fácilmente disponible, y se ha demostrado que resulta eficaz en los campos de la síntesis peptídica y similares.

Agente de condensación por deshidratación

Entre los ejemplos del agente de condensación por deshidratación utilizado en la reacción de condensación se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, hidrocloreto de 1-etil-3-dimetilaminopropil-carbodiimida, sulfonato de 1-ciclohexil-(2-morfonil-4-etil)-carbodiimida-meso-p-tolueno y similares. De entre ellos, resulta preferido el hidrocloreto de 1-etil-3-dimetilaminopropil-carbodiimida (en adelante en la presente memoria en ocasiones denominado EDC-HCl), debido a que se ha utilizado como agente de condensación soluble en agua de uso general en los campos de la síntesis peptídica y similares.

Cantidad de biotina introducida

La cantidad de biotina introducida en la proteína marcada con biotina puede controlarse mediante el ajuste de la proporción molar de proteína y biotina. Resulta preferida una cantidad más grande de biotina introducida a fin de potenciar el rendimiento, tal como la sensibilidad. Más específicamente, el número de moles de biotina por cada mol de la proteína es preferentemente de 1.0 mol o superior, más preferentemente de 5.0 moles o superior, y todavía más preferentemente de 10.0 moles o superior. Las proporciones molares mencionadas anteriormente son únicamente ejemplos. La proporción molar puede incrementarse o reducirse apropiadamente según el tipo de proteína y la sensibilidad real.

Unión de proteína marcada con biotina y partículas de detección

El método de unión de la proteína marcada con biotina y las partículas de detección no se encuentra particularmente limitado. Por ejemplo, puede utilizarse la adsorción física mediante unión hidrófoba o conjugación mediante enlace covalente. En la unión hidrófoba, se une directamente una proteína marcada con biotina a la capa superficial de partículas de detección. Por lo tanto, resulta preferido el tratamiento a un pH próximo al punto isoeléctrico de la proteína marcada con biotina. En la unión covalente, el método de unión puede variar según el grupo funcional sobre la superficie de las partículas de detección. Por ejemplo, en el caso de que el grupo funcional presente sobre la superficie de las partículas de detección sea un grupo amino, la unión puede formarse mediante el método de la N-hidroxisuccinimida.

La temperatura de reacción no se encuentra particularmente limitada. El límite inferior de la temperatura de reacción es preferentemente de 10°C, y más preferentemente de 20°C o superior. El límite superior de la temperatura de reacción es preferentemente de 50°C, y más preferentemente de 40°C o inferior. El tiempo de reacción puede variar según la temperatura de reacción y es preferentemente de 1 hora o superior y de 24 horas o inferior, y más preferentemente de 2 horas o superior y de 12 horas o inferior.

El compuesto de N-hidroxiamina no reaccionado y el agente de condensación por deshidratación contenidos en la mezcla de reacción pueden separarse fácilmente respecto de un solvente acuoso mediante, por ejemplo, filtración o centrifugación.

Reactivo de detección que se une específicamente al analito

El reactivo de detección que se une específicamente al analito son partículas de detección que han unido a las

5 mismas un anticuerpo capaz de unión al analito en una muestra biológica (en adelante en la presente memoria en ocasiones denominado anticuerpo de detección). El anticuerpo de detección que debe utilizarse puede variar según el tipo de analito. El anticuerpo de detección que debe utilizarse puede ser un producto disponible comercialmente, o producido de otro modo mediante un método conocido. El tamaño molecular, además, no se encuentra particularmente limitado.

Anticuerpo para la captura de analito

10 El anticuerpo para la captura de un analito (en adelante en la presente memoria en ocasiones denominado anticuerpo de captura) puede ser un producto disponible comercialmente, o producido de otro modo mediante un método conocido. Como anticuerpo de captura se utiliza preferentemente un anticuerpo que reconozca un sitio del analito que es diferente del sitio reconocido por un anticuerpo de detección. El tamaño molecular, además, no se encuentra particularmente limitado. Entre los ejemplos de anticuerpos de captura para la medición de la

15 gonadotropina coriónica humana se incluyen anti-GCh₁₆₄₆₁₅₇ (V-24), humana (de conejo) (producida por Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-GCh/gonadotropina coriónica, humana (de ratón) (producida por LifeSpan BioSciences, Inc.), anti-CGB/hCG β , humana (de ratón) (producida por LifeSpan BioSciences, Inc.), anti-gonadotropina coriónica, humana (de conejo) (producida por EY Laboratories, Inc.), anti- β -GCH, humana (de ratón) (producida por Boster Immunoleader), anti-GC α (α -HCG), humana (de conejo) (producida por R&D Systems Inc.), y similares.

Anticuerpo que captura el reactivo de detección de línea de control

25 El anticuerpo que captura un reactivo de detección de línea de control se refiere específicamente a un anticuerpo que captura la biotina (en adelante en la presente memoria denominado anticuerpo antibiotina). El anticuerpo antibiotina que debe utilizarse puede ser un producto disponible comercialmente o puede producirse mediante un método conocido. El tamaño molecular, además, no se encuentra particularmente limitado. Entre los ejemplos de anticuerpos antibiotina se incluyen anticuerpo antibiotina (producido por GeneTex, Inc.), antibiotina, policlonal de cabra (producido por Bethyl Laboratories, Inc.), fracción IgG de anticuerpo monoclonal de ratón antibiotina (producido por Iwai Chemicals Company), y similares.

Almohadilla de membrana porosa

35 El anticuerpo de captura se inmoviliza sobre el lado de aguas arriba (línea de ensayo) de una almohadilla de membrana porosa, mientras que un anticuerpo antibiotina se inmoviliza sobre el lado de aguas abajo (línea de control) de la almohadilla de membrana porosa para producir una almohadilla de membrana porosa que pueda utilizarse en inmunocromatografía y similar. Estos anticuerpos pueden inmovilizarse fácilmente sobre almohadillas de membrana porosa que se utilizan generalmente en inmunocromatografía, etc. Entre los ejemplos de materiales de dichas almohadillas de membrana porosa se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, celulosa, derivados de celulosa, nitrocelulosa, acetato de celulosa, poliuretano, poliéster, polietileno, cloruro de polivinilo, fluoruro de polivinilideno, náilon y similares. Resultan preferidos membranas, tejidos, matrices fibrosas o no tejidas y similares compuestas de dichos materiales. Resultan preferidas las membranas de derivado de celulosa, y resultan más preferidas las membranas de nitrocelulosa.

45 A continuación se describe un ejemplo de la pieza de prueba inmunocromatográfica de la presente invención haciendo referencia a los dibujos adjuntos. En la figura 1, 1 es una almohadilla de membrana porosa; 2 es una almohadilla de muestra; 3 es una almohadilla de conjugación; 4 es una almohadilla absorbente; 5 es un sitio de inmovilización en el que se inmoviliza un anticuerpo de captura (línea de ensayo); 6 es un sitio de inmovilización en el que se inmoviliza un anticuerpo antibiotina (línea de control); y 7 es una hoja adhesiva.

50 Un ejemplo de la almohadilla de membrana porosa representado en la figura 1 es una membrana de nitrocelulosa que presenta una forma de tira con una anchura de 4 mm y una longitud de 60 mm. La almohadilla de conjugación de una pieza de prueba inmunocromatográfica se impregna con un reactivo de detección, que se une específicamente a un analito y un reactivo de detección de línea de control. Se forma una línea de ensayo 5 que presenta un anticuerpo de captura inmovilizado en la misma, en una localización aproximadamente a 10 mm de la parte terminal en el lado inicial de revelado cromatográfico de una membrana de nitrocelulosa. Se forma una línea de control 6 que presenta un anticuerpo antibiotina inmovilizado en la misma, en una localización aproximadamente a 15 mm de la parte terminal en el lado inicial de revelado cromatográfico de la membrana de nitrocelulosa.

60 La pieza de prueba inmunocromatográfica tal como se muestra en la figura 1 puede producirse de la manera siguiente. Se adhiere una almohadilla de membrana porosa 1 en una posición sustancialmente intermedia de una hoja adhesiva 7. Una almohadilla de muestra 2 y una almohadilla de conjugación 3 se unen a una parte terminal de la almohadilla de membrana porosa 1 de manera que la almohadilla de conjugación 3 se encuentre parcialmente solapada por la almohadilla de membrana porosa 1, mientras que una almohadilla absorbente 4 se une a la otra parte terminal de la almohadilla de membrana porosa 1 de manera que la almohadilla absorbente 4 está solapada por la almohadilla de membrana porosa 1.

La almohadilla de muestra 2 no se encuentra particularmente limitada con la condición de que esté realizada en un material que pueda absorber rápidamente y revelar una muestra biológica. Entre los ejemplos de la almohadilla de muestra 2 se incluyen papel de filtro de celulosa, tejidos no tejidos de celulosa o almohadillas similares que comprenden una resina sintética porosa, tal como polietileno o polipropileno. Entre ellas, resulta preferido el papel de filtro.

La almohadilla de conjugación 3 no se encuentra particularmente limitada con la condición de que pueda mantener un reactivo de detección en un estado seco y pueda liberar rápidamente el reactivo de detección mientras se revela una muestra biológica. Entre los ejemplos de la almohadilla de conjugación 3 se incluyen filtros de fibra de vidrio, filtros de celulosa, tejidos no tejidos de poliéster y similares. Resultan más preferidas las fibras de vidrio.

La almohadilla absorbente 4 no se encuentra particularmente limitada con la condición de que pueda absorber rápidamente y mantener una muestra biológica. Entre los ejemplos de la almohadilla absorbente 4 se incluyen papeles de filtro de celulosa, tejidos no tejidos de celulosa o almohadillas similares que comprenden una resina sintética porosa, tal como polietileno o polipropileno. Entre ellas, resulta preferido el papel de filtro de celulosa.

La pieza de prueba inmunocromatográfica puede alojarse en una caja de plástico apropiada en la que se proporcionan una abertura para inyectar una muestra biológica y aberturas para cuantificar la cantidad de partículas de detección capturadas en la parte superior de la almohadilla de muestra 2, línea de ensayo 5 y línea de control 6.

Método para producir la pieza de prueba inmunocromatográfica

El método para producir la pieza de prueba inmunocromatográfica de la presente invención no se encuentra particularmente limitado. Por ejemplo, la almohadilla de conjugación puede producirse mediante la aplicación uniforme de una determinada cantidad de un reactivo de detección a fibras de vidrio en forma de tira, seguido del secado en un baño termostático a una temperatura adecuada durante un periodo de tiempo fijado. El anticuerpo de captura y el anticuerpo antibiotina pueden aplicarse en cantidades fijas en una almohadilla de membrana porosa para formar líneas en la misma. El método de aplicación en la almohadilla de membrana no se encuentra particularmente limitado. Por ejemplo, puede utilizarse un dispensador de inmunocromatografía disponible comercialmente. Las cantidades de anticuerpo de captura y anticuerpo antibiotina aplicadas no se encuentran particularmente limitadas y preferentemente son de 10 µl o menos, más preferentemente de 8 µl o menos, todavía más preferentemente de 6 µl o menos, por cada 10 cm de longitud de la línea. Las concentraciones del anticuerpo de captura y del anticuerpo antibiotina no se encuentran particularmente limitadas y preferentemente son de entre 2.0 y 0.1 mg/ml, más preferentemente de entre 1.8 y 0.2 mg/ml, y todavía más preferentemente de entre 1.6 y 0.3 mg/ml.

El anticuerpo de captura y el anticuerpo antibiotina aplicados en la almohadilla de membrana pueden inmovilizarse muy fácilmente sobre la almohadilla de membrana meramente mediante secado. La temperatura de secado no se encuentra particularmente limitada y es preferentemente de entre 20°C y 80°C, más preferentemente de entre 30°C y 70°C, y todavía más preferentemente de entre 40°C y 60°C. El tiempo de secado varía según la temperatura de secado y habitualmente es de entre 5 y 120 minutos, y preferentemente de entre 10 y 60 minutos.

En la presente invención, el kit de análisis inmunocromatográfico comprende un diluyente para muestras para el pretratamiento o dilución de una muestra biológica, una pieza de prueba inmunocromatográfica y un dispositivo analizador.

Método para medir el analito utilizando la pieza de prueba inmunocromatográfica

El método de medición utilizando la pieza de prueba inmunocromatográfica no se encuentra particularmente limitado. Por ejemplo, puede utilizarse el método siguiente. En primer lugar, en caso necesario, se mezcla una muestra biológica con un solvente de revelado apropiado de manera que se obtiene una mezcla que puede revelarse cromatográficamente. A continuación, la mezcla se inyecta sobre (se añade gota a gota) la almohadilla de muestra 2. La mezcla pasa a través de la almohadilla de muestra 2 y se revela en la almohadilla de conjugación 3. Mientras la muestra biológica disuelve un reactivo de detección y un reactivo de línea de control impregnados en la almohadilla de conjugación 3, un analito y el reactivo de detección forman un complejo inmunitario y la mezcla se revela en una almohadilla de membrana porosa. A continuación, la mezcla fluye hacia el lado de la almohadilla absorbente 4 por acción capilar. Al alcanzar la mezcla la línea de ensayo 5 sobre la almohadilla de membrana porosa, el complejo inmunitario resulta capturado por un anticuerpo de captura y se acumula, de manera que la línea de control 5 adquiere un color. El solvente de revelado que contiene un reactivo de detección de línea de control supera la línea de ensayo 5 y alcanza la línea de control 6. El reactivo de detección de línea de control resulta captura por el anticuerpo antibiotina y se acumula, de manera que la línea de control 6 adquiere color. El otro solvente de revelado resulta finalmente absorbido por la almohadilla absorbente. La concentración del analito puede determinarse mediante la medición de la intensidad de revelado de color en la línea de ensayo 5 y la línea de control 6, utilizando, por ejemplo, un lector inmunocromatográfico.

Intensidad de revelado de color en la línea de control

La intensidad de revelado del color en la línea de control no se encuentra particularmente limitada con la condición de que se encuentre a niveles de intensidad del color que puedan observarse a ojo desnudo o detectarse mediante la utilización de un lector inmunocromatográfico. La intensidad de revelado del color preferentemente se encuentra comprendida en el intervalo de entre 10 mAbs y 500 mAbs, más preferentemente de entre 50 mAbs y 450 mAbs, y todavía más preferentemente de entre 100 mAbs y 400 mAbs. La intensidad de revelado del color es preferentemente constante, con independencia de la concentración del analito que debe detectarse. Más específicamente, el coeficiente de variación de la intensidad de revelado del color es preferentemente de 20% o inferior, más preferentemente de 10% o inferior, y todavía más preferentemente de 5% o inferior.

El coeficiente de variación puede calcularse mediante las fórmulas 1 y 2 a continuación.

Fórmula 1:

$$\text{Desviación estándar} = \sqrt{\frac{\text{Suma de (valor de medición - valor medio)}^2}{\text{Número de datos}}}$$

Fórmula 2:

$$\text{Coeficiente de variación (\%)} = (\text{Desviación estándar} / \text{Valor medio}) \times 100$$

Ejemplos

La presente invención se describe a continuación en detalle haciendo referencia a los ejemplos. Sin embargo, debería apreciarse que la presente invención no se encuentra limitada a dichos ejemplos.

Ejemplo 1

Preparación de reactivo de detección de GCh

Se añadieron 50 µl de Tris-HCl 10 mM con un pH de 9.2 a 125 µl de una disolución de coloide de oro (DO₅₂₀=12) (WRGH1, producida por Winered Chemical Co., Ltd.) y se sometió a agitación en vórtex. Un anticuerpo monoclonal anti-GCH disponible comercialmente (nombre de producto: anti-CGB/hCG β, humano (de ratón), número de producto: LS-C196902-100, producido por LifeSpan Biosciences, Inc.) se ajustó a una concentración de 0.1 mg/ml utilizando Tris-HCl 10 mM. Tras añadir 100 µl de la disolución de anticuerpo monoclonal anti-GCh a la disolución de coloide de oro y agitar en vórtex, la mezcla resultante se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después, se añadieron 200 µl de una disolución acuosa de fragmento peptídico bloqueante al 0.3% en peso (producido por Toyobo Co., Ltd.) (en adelante en la presente memoria en ocasiones denominado BPF) + PEG20000 al 1.0% en peso (producido por Santa Cruz Technology Inc.) (en adelante en la presente memoria en ocasiones denominado PEG) y se sometió a agitación en vórtex; la mezcla resultante se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, la mezcla se centrifugó a 7000 rpm durante 10 minutos y se separó el sobrenadante. Después, se añadieron 200 µl de una disolución acuosa de BPF al 0.3% en peso + PEG al 1.0% en peso y se agitó en vórtex; la mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla se centrifugó a 7000 rpm durante 10 minutos y se separó el sobrenadante. Después, se añadió 1 ml de una disolución acuosa de BPF al 0.3% en peso + D(+)-trehalosa al 5.0% en peso (producida por Nacalai Tesque, Inc.) y se sometió a agitación en vórtex; la mezcla resultante se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Preparación de reactivo de detección de línea de control

Se disolvieron 3.15 mg de D-biotina (producida por Nacalai Tesque, Inc.) en 72 µl de agua destilada. Se disolvieron 10 mg de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (producida por Nacalai Tesque, Inc.) y 10 mg de N-hidroxisuccinimida (producida por Nacalai Tesque, Inc.) en 100 µl de agua destilada. Se añadió disolución de D-biotina a lo anterior y la mezcla resultante se sometió a agitación suave a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, se añadieron 80 µl de una disolución de BPF al 3% en peso a la disolución; la mezcla resultante se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos para preparar una disolución de BPF marcada con biotina. Seguidamente, se añadieron 450 µl de Tris-HCl 10 mM con un pH de 9.2 a 50 µl de una disolución de coloide de oro (DO₅₂₀=12) y se sometió a agitación en vórtex. Además, se añadieron 15 µl de una disolución de BPF marcada con biotina a la disolución de oro coloidal y se sometió a agitación en vórtex; la mezcla resultante se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después, se añadieron 200 µl de una disolución acuosa de BPF al 0.3% + PEG20000 al 1.0% en peso (producido por Santa Cruz Biotechnology Inc.) (en adelante en la presente memoria en ocasiones denominado PEG) y se sometió a agitación en vórtex; la mezcla resultante se dejó en

reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, la mezcla se centrifugó a 7000 rpm durante 10 minutos y se separó el sobrenadante. Después, se añadieron 200 µl de una disolución acuosa de BSA al 0.3% en peso + PEG al 1.0% en peso y se sometió a agitación en vórtex; la mezcla resultante se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla resultante se centrifugó a 7000 rpm durante 10 minutos y se separó el sobrenadante. Después, se añadió 1 ml de una disolución acuosa de BFP al 0.3% en peso + D(+)-trehalosa al 5% en peso (producida por Nacalai Tesque, Inc.) y se sometió a agitación en vórtex; la mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Preparación de almohadilla de membrana porosa para la detección de GCh

Se aplicó una disolución 0.5 mg/ml de un anticuerpo monoclonal anti-GCH (nombre de producto: gonadotropina anticoriónica, humana (conejo), número de producto: AT-2601-2, EY Laboratories, Inc.) (KH_2PO_4 50 mM, pH 7.0 + sacarosa al 5% en peso) en una cantidad de aproximadamente 1.0 µl/cm en un sitio situado aproximadamente a 10 mm de la parte terminal (el lado de aguas arriba) de una membrana de nitrocelulosa (nombre comercial: Hi-Flow Plus HF 120 (producido por Merck Millipore Co., Ltd.) que presentaba un tamaño de 25 mm x 150 mm de manera que se formase una línea de ensayo con una anchura de aproximadamente 1 mm utilizando un dispensador de inmunocromatografía. Después, se aplicó una disolución 1.0 mg/ml de un anticuerpo monoclonal antibiotina (nombre de producto: Anti-Biotin antibody, número de producto: GTX44344, producido por GeneTex, Inc.) (KH_2PO_4 50 mM, pH 7.0 + sacarosa al 5% en peso) en una cantidad de aproximadamente 1.0 µl/cm en un sitio situado aproximadamente a 15 mm de una parte terminal (el lado de aguas arriba) de la membrana de nitrocelulosa de manera que formase una línea de control con una anchura de la línea de aproximadamente 1 mm utilizando un dispensador de inmunocromatografía. A continuación, la membrana resultante se secó a 50°C durante 30 minutos.

Producción de la almohadilla de conjugación para la medición de GCh

Se aplicó uniformemente 1.0 ml de una mezcla del reactivo de detección de GCh y el reactivo de detección de línea de control (proporción de mezcla de 1:1) en una almohadilla de conjugación con un tamaño de 10 mm x 150 mm (nombre comercial: SureWick (producido por Merck Millipore Co., Ltd.)). A continuación, la almohadilla resultante se secó bajo presión reducida a temperatura ambiente en un desecador durante la noche a fin de preparar una almohadilla de conjugación para la medición de GCh impregnada con un reactivo de detección de GCh y un reactivo de detección de línea de control.

Producción de pieza de prueba para la medición de GCh

Se produjo una pieza de prueba para la medición de GCh en una disposición de lado a lado, que se utiliza generalmente en inmunocromatografía. Específicamente, se conectaron en serie entre sí una almohadilla de muestra (nombre comercial: SureWick (producido por Merck Millipore Co., Ltd.)), una almohadilla de conjugación (nombre comercial: SureWick (producida por Merck Millipore Co., Ltd.)), una membrana de nitrocelulosa (nombre comercial: Hi-Flow Plus HF 120 (producida por Merck Millipore Co., Ltd.)) y una almohadilla absorbente (nombre comercial: SureWick (producida por Merck Millipore Co., Ltd.)). Después, el producto resultante se cortó con una cuchilla en una pieza de prueba con una anchura de aproximadamente 4 mm y una longitud de aproximadamente 60 mm.

Preparación de muestra de GCh

Se diluyó un antígeno GCh disponible comercialmente con KH_2PO_4 50 mM con un pH de 7.2 + BSA al 1.0% en peso + NaN_3 al 0.1% en peso a fin de preparar muestras de GCh que presentaban concentraciones de 1 UI/l, 10 UI/l, 100 UI/l y 1,000 UI/l.

Medición de GCh

Las piezas de ensayo producidas para la medición de GCh se colocaron en un soporte horizontal. A continuación, se pipetearon 40 µl de cada uno de los 4 niveles preparados de muestra de GCh y se añadieron gota a gota a almohadillas de muestra de las piezas de ensayo. La figura 2 es una fotografía obtenida 10 minutos después de la adición gota a gota de las muestras. La intensidad de revelado de color en las líneas de ensayo se incrementó según la concentración de GCh. La intensidad del revelado de color en las líneas de control no resultó afectada por la concentración de GCh y el coeficiente de variación de la intensidad de revelado del color fue de 2.15%.

Cuantificación de GCh

Se midió la intensidad de revelado del color en las piezas de ensayo para la medición de GCh utilizando un lector inmunocromatográfico. Se utilizó C10060-10 (producido por Hamamatsu Photonics, K.K.) como el lector inmunocromatográfico. La figura 3 representa los resultados. Se confirmó que las líneas de ensayo presentaban una absorbancia de reflexión lineal según la concentración de GCh. Se confirmó que la absorbancia de reflexión de la línea de control era de aproximadamente 300 mAbs y que no resultó afectada por la concentración de GCh.

Ejemplo comparativo 1

Preparación de almohadilla de membrana porosa para la detección de GCh

Se formó una línea de control de la misma manera que en el ejemplo 1, con la excepción de que se aplicó una disolución de anticuerpo policlonal anti-IgG 1.0 mg/ml (KH_2PO_4 50 mM, pH 7.2) en una cantidad de aproximadamente 1.0 $\mu\text{l}/\text{cm}$ utilizando el dispensador. A continuación, la membrana resultante se secó a 50°C durante 30 minutos para preparar una almohadilla de membrana porosa para la detección de GCh.

Producción de almohadilla de conjugación para la medición de GCh

Se preparó una almohadilla de conjugación para la medición de GCh de la misma manera que en el ejemplo 1, con la excepción de que únicamente se aplicó uniformemente un reactivo de detección de GCh como reactivo de detección (es decir, sin aplicar un reactivo de detección de línea de control).

Medición de GCh utilizando piezas de ensayo de GCh

Mediante la utilización de las piezas de ensayo para la medición de GCh producidas mediante la utilización de la almohadilla de membrana porosa y la almohadilla de conjugación preparadas anteriormente, se midió la GCh de la misma manera que en el ejemplo 1. La figura 4 representa una fotografía obtenida 10 minutos después de la adición de cada muestra gota a gota. La intensidad de revelado del color en las líneas de ensayo se incrementó en dependencia de la concentración de GCh. La intensidad de revelado del color en las líneas de control se redujo al incrementarse la concentración de GCh.

Cuantificación de GCh utilizando piezas de ensayo de GCh

Se midió la intensidad de revelado del color en las piezas de ensayo para la medición de GCh utilizando un lector inmunocromatográfico de la misma manera que en el ejemplo 1. La figura 5 representa los resultados. La densidad de color de las líneas de ensayo se incrementó de una manera dependiente de la concentración de GCh. La absorbancia de reflexión de las líneas de control se redujo desde aproximadamente 200 mAbs a 80 mAbs al incrementar la concentración de GCh. El coeficiente de variación de la intensidad de revelado del color era de 30.3%.

Según la presente invención, puede proporcionarse una pieza de prueba inmunocromatográfica conveniente de elevada precisión de medición.

Descripción de los números de referencia

1. Almohadilla de membrana porosa
2. Almohadilla de muestra
3. Almohadilla de conjugación
4. Almohadilla absorbente
5. Línea de ensayo
6. Línea de control
7. Hoja adhesiva

REIVINDICACIONES

- 5 1. Pieza de prueba inmunocromatográfica para cuantificar un analito en una muestra biológica, comprendiendo la pieza de prueba inmunocromatográfica
- 10 a) una almohadilla de conjugación impregnada con un reactivo de detección que se une específicamente al analito, y un reactivo de detección de línea de control, y
- b) una almohadilla de membrana porosa sobre la que se inmoviliza aguas arriba un anticuerpo para capturar el analito, y se inmoviliza aguas abajo un anticuerpo para capturar específicamente el reactivo de detección de línea de control,
- 15 en la que el reactivo de detección de línea de control comprende unas partículas de detección que presentan una proteína marcada con biotina unida a las mismas, y en la que la proteína es una proteína derivada de un microorganismo, y la proteína derivada de un microorganismo es un fragmento peptídico bloqueante.
- 20 2. Pieza de prueba inmunocromatográfica según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo para capturar específicamente el reactivo de detección de línea de control es un anticuerpo anti-biotina.
3. Método para cuantificar un analito en una muestra biológica, comprendiendo el método utilizar la pieza de prueba inmunocromatográfica según la reivindicación 1 o 2.
- 25 4. Kit de análisis inmunocromatográfico que comprende la pieza de prueba inmunocromatográfica según la reivindicación 1 o 2, un diluyente de muestras y un dispositivo analizador.
5. Método para producir la pieza de prueba inmunocromatográfica según la reivindicación 1 o 2.

Fig. 1

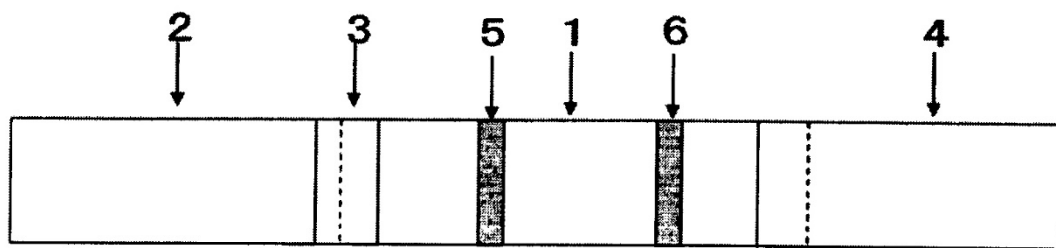


Fig. 2

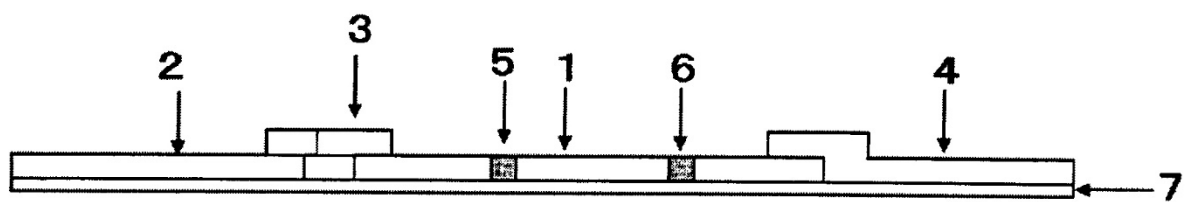


Fig. 3

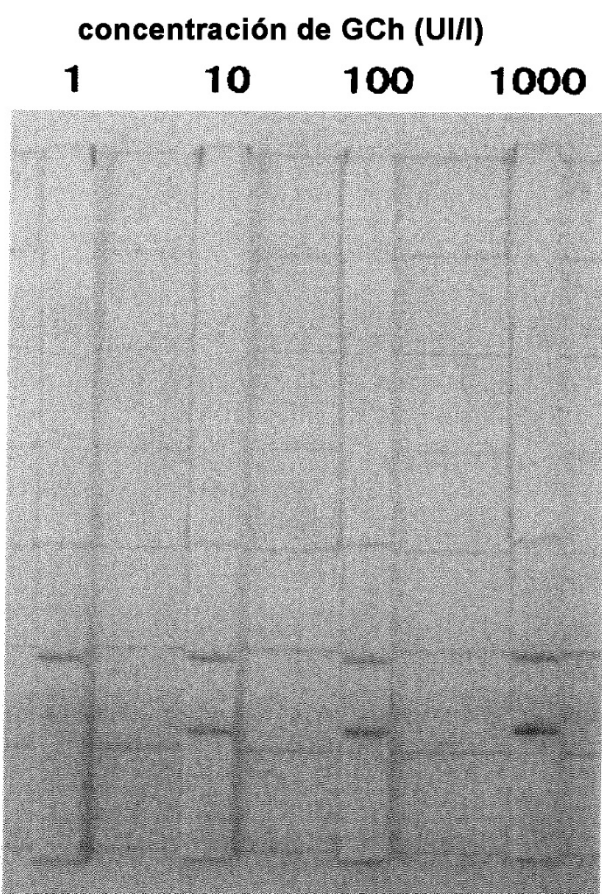
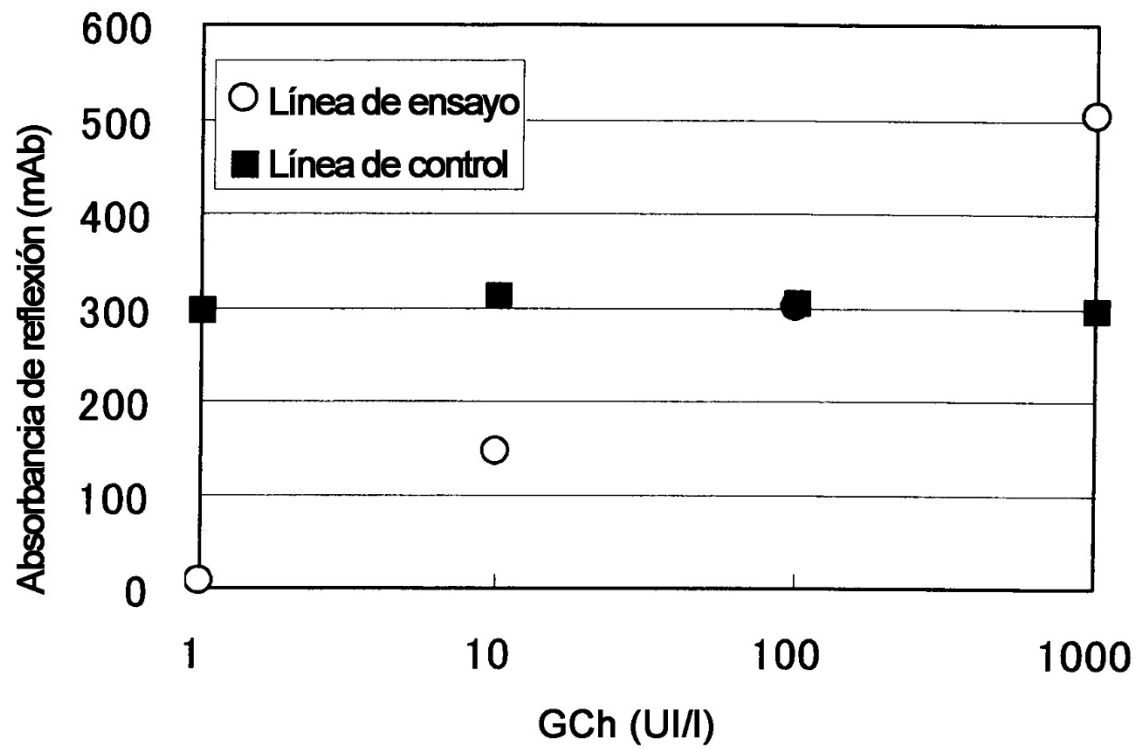


Fig. 4



GCh (UI/l)	1	10	100	1000	Media	Desv. estándar	Coeficiente de variación
Absorbancia de reflexión (mAbs)	298.6	314.86	307.36	299.68	305.13	6.6	2.15

Fig. 5

concentración de GCh (UI/l)
1 10 100 1000

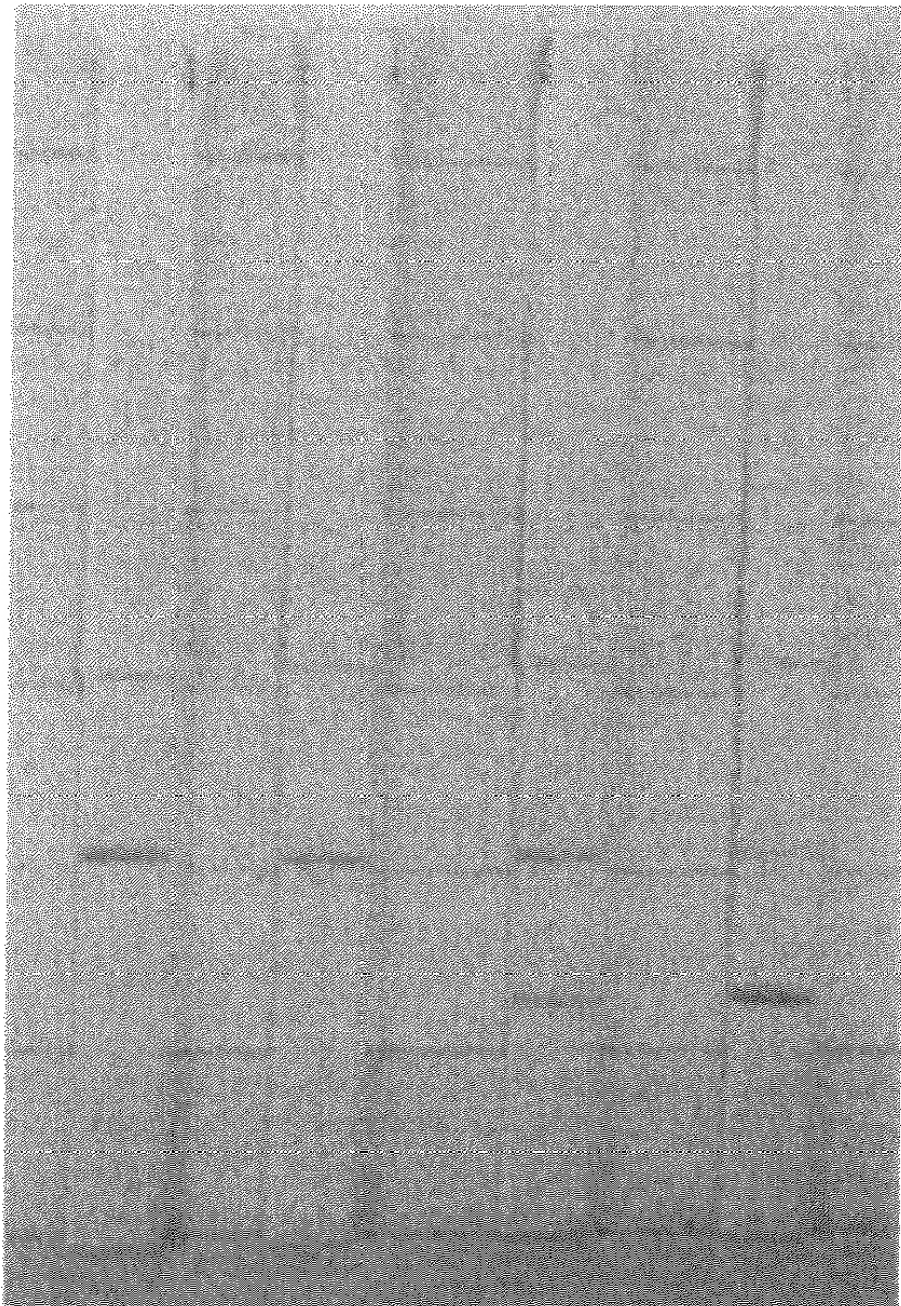
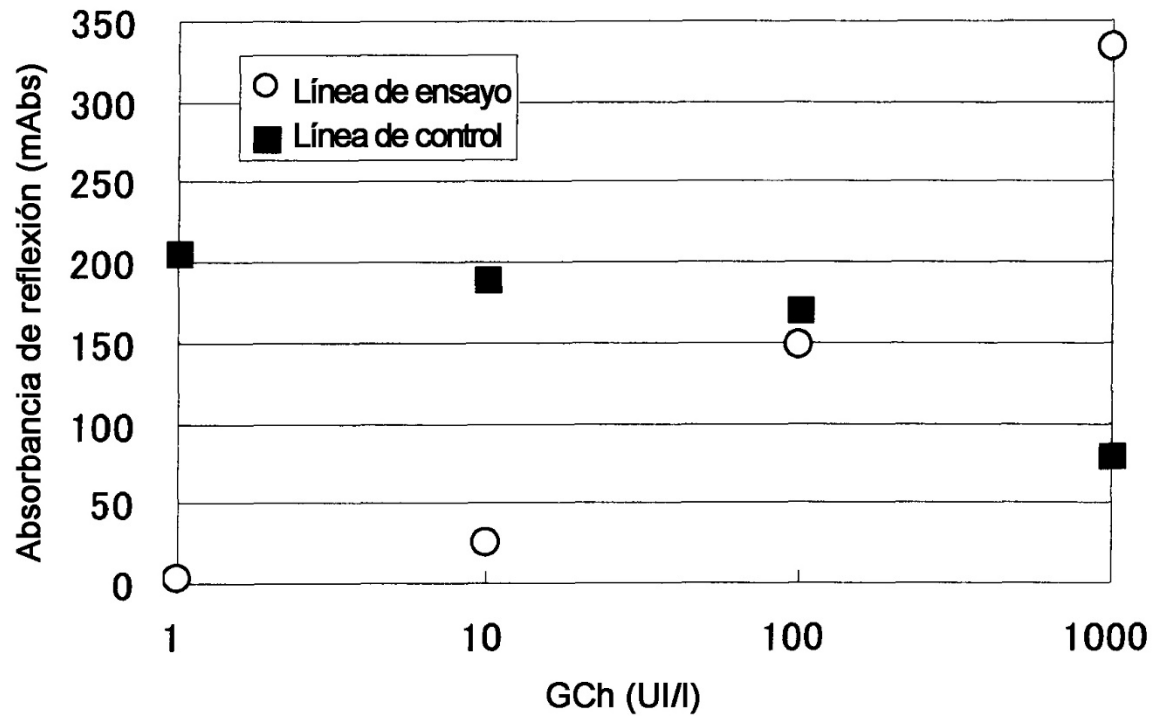


Fig. 6



GCh (UI/l)	1	10	100	1000	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación
Absorbancia de reflexión (mAbs)	206	190.3	170.9	79.7	161.73	49.0	30.3