

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 201**

51 Int. Cl.:

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/80 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2015** **PCT/EP2015/001067**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2015** **WO15180834**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2015** **E 15725997 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2024** **EP 3149477**

54 Título: **Dispositivo y método para detectar antígenos de grupo sanguíneo por medio de un anticuerpo incompleto**

30 Prioridad:

26.05.2014 DE 102014007851

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

19.11.2024

73 Titular/es:

GRIFOLS DIAGNOSTIC SOLUTIONS INC.
(100.0%)
4560 Horton Street
Emeryville, CA 94608, US

72 Inventor/es:

SCHWIND, PETER y
CAESAR, ARIANE

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 988 201 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

Dispositivo y método para detectar antígenos de grupo sanguíneo por medio de un anticuerpo incompleto

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a dispositivos y métodos para la determinación de antígenos de grupo sanguíneo con un anticuerpo incompleto, en particular para la determinación simultánea de antígenos de grupo sanguíneo.

10 **Estado de la técnica**

En el diagnóstico serológico de grupos sanguíneos en general se detectan parámetros que son importantes en especial en relación con transfusiones o enfermedad hemolítica del recién nacido. Esto incluye entre otros la detección de antígenos en la superficie de eritrocitos, que son característicos para los grupos sanguíneos. También se encuentran sistemas de antígenos importantes adicionales en trombocitos, granulocitos, linfocitos, que también desempeñan un papel en transfusión y/o trasplante.

Como se sabe, para la determinación de los antígenos de grupo sanguíneo los eritrocitos de la persona que se prueba (donante o receptor) se mezclan con reactivos, que contienen anticuerpos específicos de grupo sanguíneo. Las pruebas son habitualmente pruebas líquidas, en las que un lote de prueba se produce mezclando una muestra que contiene eritrocitos con una muestra que contiene anticuerpos dirigidos contra una característica de grupo sanguíneo específico. El lote de prueba se incuba después durante un periodo de tiempo definido y en condiciones definidas y después de completar la incubación o bien directamente o después de una etapa de centrifugación el lote se comprueba ya sea visualmente o con métodos ópticos para una posible aglutinación o adsorción de eritrocitos. La medida final predominante en la serología de grupos sanguíneos sigue siendo la hemaglutinación. Los anticuerpos aglutinantes directos también se denominan anticuerpos completos en la serología de grupos sanguíneos. Los anticuerpos que no pueden aglutinar eritrocitos directamente, se denominan de forma análoga en la serología de grupos sanguíneos anticuerpos incompletos.

Del documento WO 2005/005991 se conoce la determinación simultánea de antígenos de grupo sanguíneo usando un formato de prueba de flujo lateral. Los ejemplos del documento WO 2005/005991 divulgan la determinación de antígenos de grupo sanguíneo con anticuerpos IgM, que son anticuerpos completos y producen directamente hemaglutinación. Sin embargo, la especificación WO no divulga la determinación de anticuerpos de grupo sanguíneo usando un anticuerpo incompleto con ayuda de una prueba de flujo lateral. El documento WO2005/005986 se refiere a un dispositivo y un método para llevar a cabo simultáneamente la determinación de grupos sanguíneos, tipado inverso y prueba de detección de anticuerpos con ayuda de un ensayo de flujo lateral.

Las pruebas de flujo lateral se usan mucho hoy en día como pruebas rápidas, por ejemplo, como pruebas de embarazo, para determinar marcadores de infecciones o como cribado para drogas. Una organización de prueba de flujo lateral consiste en un soporte sólido al que se aplica una zona de trabajo para la muestra que se va a ensayar, una membrana separadora en la que están unidos elementos de unión, por ejemplo, anticuerpos o antígenos de captura, y en la que se pueden detectar las reacciones de unión, y una región de absorción absorbente que permite que la muestra que se va a ensayar fluya a través de la membrana separadora.

Las membranas de prueba de las pruebas de flujo lateral convencionales en general se describen como que tienen separación similar a cromatografía. El analito en la muestra se une específicamente a los elementos de unión fijados en una membrana, que en general están organizados como zonas indicadoras en bandas localizadas una detrás de otra o una encima de otra. El complejo de unión se hace visible mediante partículas indicadoras, que en general ya están presentes en la organización en forma seca en una almohadilla de liberación conjugada. La almohadilla de liberación conjugada típicamente está dispuesta entre la zona de trabajo y la membrana. Las partículas indicadoras coloreadas prerrecubiertas se recubren, por ejemplo, con un anticuerpo dirigido contra el analito que se busca.

Las características de grupos sanguíneos más importantes que hoy en día se deben clarificar rutinariamente en pruebas pretransfusión en pacientes y donantes son: A, B, C, D, E, ce, Cw, K, k, Jka, Jkb, Fya, Fyb, M, N, S, s, Pl, Lea, Leb, Kpa, Kpb, Lua, Lub. Los antígenos o epítomos antigénicos que se van a ensayar son, a modo de ejemplo, los del sistema de grupos sanguíneos ABO, del sistema Rh, Kell, Lewis-Hh, Duffy-Kidd, MNS, Luteran, P, los sistemas de grupos sanguíneo Diego, Yt, Scianna, Dombrock, Colton, Chido/Rodgers, Gerbich, Cromer, Knops, Landsteiner-Wiener, Xg, Kx, Indian, Ok, Raph, John Milton Hagen, Langreiss, Sid, FORS, JR y/o LAN, especialmente A1, A2, AB, B, D, C, c, E, e, Cw, K, k, M, N, S, s, Jka, Jkb, Fya, Fyb, Kpa, Kpb, Jsa, Js b, Lea, Leb, Lua, Lub, P1, 1, H, Xga, U, Vw, Wra, Lan, Vel, Dia y/o Mia.

Debido a su carga superficial neta negativa y al potencial zeta ejercido mediante ello, los eritrocitos tienen una distancia mínima estadística natural de aprox. 300 angstrom entre las células. Esa distancia mínima se puede puentear por anticuerpos de clase IgM debido al tamaño de la molécula en medio fisiológico, pero de forma natural no por anticuerpos de la clase IgG. Esto significa que, por regla general, solo los anticuerpos de la clase IgM están disponibles en la serología de grupos sanguíneos para una medida final directa por hemaglutinación. Los anticuerpos de

aglutinación directa también se denominan anticuerpos completos en la serología de grupos sanguíneos (la mayoría de los anticuerpo IgM son anticuerpos completos).

Según el estado de la técnica actual, los grupos sanguíneos en general no se pueden detectar por medio de anticuerpo IgG por hemaglutinación directa. Los anticuerpos que no pueden aglutinar eritrocitos directamente se denominan de forma análoga en la serología de grupos sanguíneos anticuerpos incompletos (la mayoría de los anticuerpo IgG son anticuerpos incompletos).

Esto lleva a la situación de que es necesario trabajar con las llamadas diferentes fases y tiempos y temperaturas de reacción según si están disponibles anticuerpos IgM (monoclonales) o, por otra parte, IgG monoclonales o anticuerpos policlonales para la detección de una propiedad de grupo sanguíneo particular, que hace los procedimientos de trabajo armonizados u homologados más difícil.

Siempre que estén disponibles anticuerpos IgM, la aglutinación directa como punto final es posible, con frecuencia sin la mezcla de anticuerpos adicionales o intensificadores o enzimas proteolíticas y sin incubación ("centrifugación inmediata"). Con la ampliamente usada técnica de gel, la incubación no es necesaria para la realización de tal prueba, la mezcla de reacción que comprende los eritrocitos que se van a ensayar y el reactivo de anticuerpo sencillamente se tiene que pipetear en las zonas de trabajo de la tarjeta de gel y centrifugar durante 9-10 minutos en medio fisiológico neutro, es decir, que no contiene anticuerpos (por ejemplo, DG Gel Neutral Card de Diagnostic Grifols). En otra variante de la misma técnica, ya se han introducido los anticuerpos específicos de grupo sanguíneo de la clase IgM en la matriz de gel. Después los eritrocitos que se van a ensayar se tienen solo que pipetear en las zonas de trabajo de la tarjeta de gel (por ejemplo, DG Gel ABO RH (2D) de Diagnostic Grifols).

Si el anticuerpo disponible para determinar una característica de grupo sanguíneo particular no pertenece a la clase IgM, se requiere un cambio de técnica/fase con el fin de hacer posible la hemaglutinación como el punto final. Este es el caso, por ejemplo, para las siguientes de las características anteriormente mencionadas, para las que no hay anticuerpos IgM comercialmente disponibles según el estado de la técnica actual: k, Fya, Kpa, Kpb, Lua. Las siguientes características adicionales son asimismo de interés, como Dia, Jsa, Jsb, Coa, Cob, Wra, Xga. No están disponibles anticuerpos monoclonales IgM comerciales para detectar ninguno de estos antígenos.

Puesto que los anticuerpos IgG en general no son capaces de superar la distancia que está presente entre dos eritrocitos debido a la repulsión natural, la reacción con un anticuerpo IgG específico de antígeno puede alcanzar solo una sensibilización (esto es, unión de anticuerpo, pero no hemaglutinación, por tanto sin punto final diagnóstico) de las células que son positivas para el antígeno particular, sin el punto final visible de hemaglutinación, que a su vez es necesaria para la detección diagnóstica visual sencilla: si, por ejemplo, un eritrocito que porta la característica de grupo sanguíneo Duffy a (Fya) se incuba con un anticuerpo anti-Fya de la clase IgG, se produce la reacción antígeno-anticuerpo (sensibilización), pero no produce el punto final visible de hemaglutinación. Con el fin de conseguir esto, las células sensibilizadas se deben además incubar con un anticuerpo específico de clase (en el caso presente anti-IgG) con cuya ayuda las células sensibilizadas con anticuerpos IgG pueden formar puentes y el punto final de hemaglutinación se puede alcanzar (prueba de Coombs indirecta). La técnica de gel, que se usa mucho para este fin, requiere un tiempo de incubación de 10-15 minutos a 37°C para esta prueba, con una centrifugación posterior de 9-10 minutos en una tarjeta anti-globulina humana o de Coombs (por ejemplo, DG Gel Coombs Card de Diagnostic Grifols).

En la técnica en tubo, que también se usa mucho, no es necesaria la incubación antes de la centrifugación durante aprox. 20 segundos en el caso de la centrifugación inmediata. Para la prueba de Coombs indirecta, primero se lleva a cabo incubación durante de 15 a 60 minutos a 37°C con el anticuerpo incompleto específico de grupo sanguíneo, después de lo cual se requieren varias etapas de lavado antes de añadir el reactivo anti-globulina humana y después se lleva a cabo centrifugación durante 20 segundos.

Por tanto, hay una necesidad para un dispositivo y un método para determinar analitos unidos a células, en particular, antígenos de grupo sanguíneo, para los que no están disponibles anticuerpos IgM estandarizados, en particular no hay anticuerpo IgM comercialmente disponible. Hay una necesidad adicional para un dispositivo y un método para determinar simultáneamente al menos dos analitos unidos a células, en donde un anticuerpo IgM estandarizado tal como un anticuerpo comercialmente disponible está disponible para solo uno de los dos analitos unidos a células, de modo que la determinación de ambos analitos en el estado de la técnica requiere un cambio de fase o técnica.

Compendio de la invención

El ámbito de la invención se define mediante las reivindicaciones.

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un dispositivo para la determinación de un antígeno de grupo sanguíneo en una muestra líquida, que comprende una matriz de separación que tiene al menos una zona indicadora, caracterizada en que la zona indicadora comprende un primer anticuerpo dirigido contra un antígeno de grupo sanguíneo, o un fragmento del mismo, y un elemento de unión dirigido contra el primer anticuerpo, en donde el primer anticuerpo es un anticuerpo incompleto.

Según una forma de realización preferida, el dispositivo comprende una membrana (2) que tiene una zona de trabajo (5) para la aplicación de la muestra líquida, al menos una zona indicadora que es capaz de interaccionar con el antígeno de grupo sanguíneo y al menos una región de absorción (3) que absorbe el líquido después de haber pasado a través de la zona indicadora, en donde la zona indicadora está situada entre la zona de trabajo (5) y una región de absorción (3), caracterizado en que la zona indicadora comprende un anticuerpo dirigido contra un antígeno de grupo sanguíneo o un fragmento del mismo y un elemento de unión dirigido contra el primer anticuerpo, en donde el primer anticuerpo es un anticuerpo incompleto.

Según una forma de realización preferida adicional, el dispositivo comprende tubos llenos con material de gel. La técnica de gel se usa para determinar la reacción de aglutinación de eritrocitos. La columna de gel actúa como un filtro, que ralentiza o detiene la migración de los eritrocitos aglutinados respecto a los eritrocitos no aglutinados y mediante ello se produce la separación.

Según la invención, la zona indicadora del gel contiene un anticuerpo dirigido contra un antígeno de grupo sanguíneo o un fragmento del mismo, y un elemento de unión dirigido contra el primer anticuerpo, en donde el primer anticuerpo es un anticuerpo incompleto.

Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un dispositivo para la determinación simultánea de un primer y un segundo antígeno de grupo sanguíneo en una muestra líquida, que comprende una membrana (2) que tiene una zona de trabajo (5) para la aplicación de la muestra líquida, al menos dos zonas indicadoras que son capaces de interaccionar con un antígeno de grupo sanguíneo y al menos una región de absorción (3) que absorbe el líquido después de haber pasado a través de la zona indicadora, en donde las zonas indicadoras están situadas entre la zona de trabajo (5) y la al menos una región de absorción (3), caracterizado en que (i) la primera zona indicadora comprende un primer anticuerpo dirigido contra el primer antígeno de grupo sanguíneo o un fragmento del mismo, y un elemento de unión dirigido contra el primer anticuerpo, en donde el primer anticuerpo es un anticuerpo incompleto y (ii) la segunda zona indicadora (a) comprende un primer anticuerpo dirigido contra el segundo antígeno de grupo sanguíneo, en donde el primer anticuerpo es un anticuerpo completo; o (b) comprende un primer anticuerpo dirigido contra el segundo antígeno de grupo sanguíneo, en donde el primer anticuerpo es un anticuerpo incompleto y un elemento de unión dirigido contra este anticuerpo.

Sorprendentemente, los inventores de la presente solicitud han encontrado que, aplicando un primer anticuerpo incompleto y un segundo anticuerpo dirigido contra el primer anticuerpo juntos en una zona indicadora, es posible configurar un dispositivo con una matriz separadora, preferiblemente en forma de membrana de un dispositivo de flujo lateral o como una matriz de gel, de tal manera que es posible determinar un antígeno de grupo sanguíneo con un anticuerpo incompleto como el primer anticuerpo. Como resultado, la determinación de un antígeno de grupo sanguíneo, para el que no hay disponibles anticuerpo de tipo IgM estandarizados, tal como comercialmente disponibles, es posible por primera vez utilizando una matriz de separación como, por ejemplo, un dispositivo de prueba de flujo lateral. Esto produce un considerable acortamiento del tiempo requerido para determinar tales analitos, que previamente se podían, en general, solo determinar por medio de una prueba de Coombs indirecta, que requiere una etapa de incubación adicional. El procedimiento según la invención también es sorprendente para el experto en la materia porque no habría asumido que, por ejemplo, mediante el uso de moléculas anti-IgG como segundo anticuerpo, estas se neutralizarían por moléculas IgG no específicas de analito presentes en alta concentración en la sangre completa.

Por tanto, no era posible en el estado de la técnica determinar dos antígenos de grupo sanguíneo simultáneamente (también en un único dispositivo de flujo lateral o en una única tarjeta de gel que tiene una pluralidad de tubos de gel para determinar una pluralidad de parámetros), en donde el primero se determina mediante un anticuerpo IgG y el segundo mediante un anticuerpo IgM, sin que se requiera para ello un cambio de técnica o fase. La presente invención, por tanto, ofrece la ventaja de la determinación simultánea con una única organización de flujo lateral, que solo requiere una única etapa de método homogénea sin diferentes medios y diferentes incubaciones.

Según un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir los dispositivos anteriores, que comprende aplicar un primer anticuerpo contra un antígeno de grupo sanguíneo, o un fragmento del mismo, y un segundo anticuerpo dirigido contra el primer anticuerpo, o un fragmento del mismo, en donde el primer anticuerpo es un anticuerpo incompleto.

Según un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un método para la determinación de al menos un antígeno de grupo sanguíneo, que comprende aplicar un primer anticuerpo dirigido contra un antígeno de grupo sanguíneo, o un fragmento del mismo, y un elemento de unión dirigido contra el primer anticuerpo en la zona indicadora, en donde el primer anticuerpo es un anticuerpo incompleto.

Según un quinto aspecto de la invención, se proporciona el uso de los dispositivos según la invención para análisis de sangre, en particular para la determinación de antígenos de grupo sanguíneo o epítomos antigénicos.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

En relación con la presente invención, los siguientes términos se deben entender como se describen a continuación:

El término "anticuerpo completo" significa un anticuerpo que produce aglutinación de eritrocitos en solución salina fisiológica. Los anticuerpos completos comprenden anticuerpos IgM o fragmentos de los mismos, siempre que los fragmentos sean aun capaces de aglutinación. Los anticuerpos IgM pueden ser monoclonales o policlonales.

El término "anticuerpo incompleto" significa un anticuerpo que, cuando se incubaba con eritrocitos no produce su aglutinación. Los anticuerpos incompletos comprenden anticuerpos IgG, anticuerpos IgA, anticuerpos IgD y anticuerpos IgE incluyendo sus subclases o fragmentos de anticuerpos de los mismos, siempre que los fragmentos sean aun capaces de unirse a un segundo anticuerpo dirigido contra el anticuerpo entero. Estos anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. El experto en la materia conoce métodos de producir anticuerpos de varias clases.

El término "analito unido a célula" significa cualquier molécula unida de forma natural a la superficie de una célula, preferiblemente de una célula humana, en particular de un eritrocito. Incluyen, por ejemplo, receptores o antígenos de grupo sanguíneo, siendo preferidos los antígenos de grupo sanguíneo.

El término "antígeno de grupo sanguíneo" incluye antígenos del sistema de grupos sanguíneos ABO, del sistema Rh, Kell, Lewis-Hh, Duffy-Kidd, MNS, Lutheran y P, de los sistemas de grupos sanguíneos Diego, Yt, Scianna, Dombrock, Colton, Chido/Rogers, Gerbich, Cromer, Knops, Landsteiner-Wiener, Xg, Kx, Indian, Ok, Raph, John Milton Hagen, Langereis, Sid, FORS, JR y/o LAN, en particular A1, A2, AB, B, D, C, c, E, e, Cw, K, k, M, N, S, s, Jka, Jkb, Fya, Fyb, Kpa, Kpb, Jsa, Jsb, Lea, Leb, Lua, Lub, P1, I, H, Xga, U, Vw, Wra, Lan, Vel, Dia y/o Mia.

Producción del dispositivo de flujo lateral

Se describe un método que en principio es adecuado para la producción de un dispositivo de flujo lateral en los documentos DE 10330982 A1 y WO 2005/005986, pero que se altera como se indica a continuación.

El método para producir un dispositivo según la invención comprende aplicar un primer anticuerpo dirigido contra un antígeno de grupo sanguíneo, o un fragmento del mismo, y un elemento de unión dirigido contra el primer anticuerpo en la zona indicadora, en donde el primer anticuerpo es un anticuerpo incompleto.

El primer anticuerpo dirigido contra un antígeno de grupo sanguíneo y el elemento de unión dirigido contra el primer anticuerpo se pueden aplicar a la membrana en la zona indicadora juntos o por separado. Cuando se aplican por separado, es preferible que tenga lugar una etapa de secado después de la aplicación del primer anticuerpo, antes de aplicar el elemento de unión. La concentración del primer anticuerpo se determina empíricamente y depende de la afinidad por el analito unido a la célula. La concentración del elemento de unión se puede optimizar por una serie de pruebas en base a la concentración del primer anticuerpo y las propiedades del mismo.

El analito que se va a determinar es un antígeno de grupo sanguíneo. El primer anticuerpo se dirige en particular preferiblemente contra un antígeno de grupo sanguíneo seleccionado de los antígenos de grupo sanguíneo A, B, AB, D, C, E, c, e, Cw, K, k, Jka, Jkb, Fya, Fyb, M, N, S, s, P1, Kpa, Kpb, Lua, Lub, Lea, Leb, Mia, Dia, Jsa, Jsb, Coa, Cob, Wra y Xga, en particular preferiblemente contra k, S, Fya, Kpa, Kpb, Lua, Lea, Leb, Mia, Lua, Lub, Dia, Jsa, Jsb, Coa, Cob, Wra y Xga. El primer anticuerpo es un anticuerpo incompleto en este caso, preferiblemente un anticuerpo IgG o IgA, en particular preferiblemente un anticuerpo IgG. Por ejemplo, se pueden usar los siguientes anticuerpos: anti-Fya: clon P3TIM (Merck Millipore, VL); anti-S: clon P3S13JS123 (Diagast, ref. 78007); anti-k: clon P3A118OL67 (Merck Millipore, FA); y anti-D: clon ESD-1 (Alba Bioscience).

El elemento de unión preferiblemente se selecciona de un anticuerpo dirigido contra el primer anticuerpo, o un fragmento del mismo, y una lectina o un fragmento de la misma. El anticuerpo dirigido contra el primer anticuerpo es en particular preferiblemente un anticuerpo anti-IgG. Los anticuerpos anti-IgG están comercialmente disponibles, en particular son preferidos el clon MS-278 (Merck Millipore) y como anticuerpo policlonal, por ejemplo, anti-globulina humana mono-tipo o anti-IgG (Medion Grifols Diagnostics). Cuando el primer anticuerpo es un anticuerpo IgA, el segundo anticuerpo es un anticuerpo anti-IgA. Los anticuerpos anti-IgA están comercialmente disponibles. Los anticuerpos anti-IgG o anti-IgA pueden ser de tipo IgM o IgG, es preferible un anti-IgG monoclonal de clase IgM. Las lectinas preferidas son proteína A y proteína G.

Siempre que se vaya a producir un dispositivo para determinar un primer y un segundo antígeno de grupo sanguíneo según el segundo aspecto de la invención, comprende (i) la primera zona indicadora un primer anticuerpo dirigido contra el primer antígeno de grupo sanguíneo, o un fragmento del mismo, y un elemento de unión dirigido contra el primer anticuerpo, en donde el primer anticuerpo es un anticuerpo incompleto y (ii) la segunda zona indicadora (a) un primer anticuerpo dirigido contra el segundo antígeno de grupo sanguíneo, en donde el primer anticuerpo es un anticuerpo completo; o (b) un primer anticuerpo dirigido contra el segundo antígeno de grupo sanguíneo, en donde el primer anticuerpo es un anticuerpo incompleto y un elemento de unión dirigido contra este anticuerpo.

Preferiblemente el primer antígeno de grupo sanguíneo se selecciona de k, Fya, Kpa, Kpb, Lua, Lub, Mia, Dia, Jsa, Js b, Coa, Cob, Wra, Xga y S, y el segundo antígeno de grupo sanguíneo se selecciona de A, B, AB, D, C, E, c, e, Cw, K, Lea, Leb, Jka, Jkb, Fyb, P1 y s.

El primer anticuerpo dirigido contra el segundo antígeno de grupo sanguíneo según la alternativa (a) es un anticuerpo completo, en particular un anticuerpo IgM, que produce directamente hemaglutinación. El primer anticuerpo dirigido contra el segundo antígeno de grupo sanguíneo según la alternativa (b) es un anticuerpo incompleto, preferiblemente el primer anticuerpo según la alternativa (b) es un anticuerpo IgG o IgA. El elemento de unión dirigido contra el primer anticuerpo según la alternativa (b) permite la determinación mediante hemaglutinación. El elemento de unión es preferiblemente un anticuerpo IgG o IgM. Alternativamente, también se puede usar una lectina como proteína A o proteína G.

La membrana del dispositivo usado según la invención es una membrana porosa. Los materiales de membrana preferidos son, por ejemplo, nitrocelulosa (por ejemplo, UniSart de Sartorius, HiFlow de Millipore, Whatman, AE99 o FF85/100 de Whatman Schleicher & Schuell), polietileno (Lateral Flo de Porex Corporation) o nailon (Novylon de CUNO). Preferiblemente, la membrana tiene un tamaño de poro tan grande como sea posible, ya que una alta porosidad de la membrana facilita la penetración, en particular, de componentes celulares de la muestra que se va a determinar, por ejemplo, de eritrocitos, en la estructura porosa. El uso de membranas absorbentes es particularmente ventajoso. Sin embargo, el dispositivo según la invención no está limitado a estas propiedades. Son preferibles todas las membranas con una alta velocidad de flujo capilar, en donde la velocidad de flujo capilar es el tiempo [s] que necesita una solución coloreada para cubrir una distancia de 40 mm en una membrana determinada. Las membranas cuya velocidad de flujo capilar es <100 son particularmente preferidas.

En una forma de realización preferida de la invención, un elemento de sellado está dispuesto en la membrana porosa después, con respecto a la dirección de flujo, de la zona de trabajo del dispositivo según la invención. Se usan elementos de sellado bi- o tridimensionales, que se colocan en la membrana porosa y con los que se crea una zona de trabajo de muestra separada del resto de la superficie de la membrana porosa. Según la invención, el elemento de sellado actúa principalmente como una barrera de líquidos y permite la distribución direccional del líquido de muestra y reactivos de ensayo en la membrana porosa. Según la invención, el elemento de sellado además sella la zona de trabajo de la muestra con el fin de prevenir que el líquido entre indeseablemente en las otras regiones del dispositivo de flujo lateral.

Formas de realización preferidas del elemento de sellado son la forma de red o canal o embudo. El elemento de sellado se produce por corte del material usado para producir el elemento de sellado. En el caso de forma de embudo o canal, el elemento de sellado está provisto con una abertura interior, que en variantes preferidas de la misma son redondas, cuadradas o rectangulares, en el caso de la forma de embudo, se estrecha hacia el lado inferior (lado de contacto con la membrana) del elemento de sellado. Los materiales preferidos para el elemento de sellado son materiales que no absorben agua (hidrofóbicos). En una forma de realización particular, los materiales se recubren en un lado con una película adhesiva, por ejemplo, adhesivo de acrilato sensible a la presión o autoadhesivo. Por tanto, el elemento de sellado se puede unir directamente a la superficie de la membrana porosa. Alternativamente, el elemento de sellado se puede conectar, por ejemplo, pegar, a la carcasa de flujo lateral, en donde en esta forma de realización la carcasa de flujo lateral presiona el elemento de sellado en la superficie de la membrana porosa y por tanto se logran las funciones del elemento de sellado.

Los materiales preferidos para formar elementos de sellado bidimensionales son cualquier forma de cinta adhesiva o papel adhesivo (por ejemplo, Tesa 4124 de Beiersdorf AG, ARcare 7815 de Adhesives Research). Los materiales preferidos para formar elementos de sellado tridimensionales son materiales de elastómeros de poro cerrado, flexibles o materiales de silicona flexibles con diferentes espesores de material, preferiblemente 3-5 mm (por ejemplo, caucho celular EPDM1140 de Pitzner, caucho de silicona o caucho sólido, dureza de 40 grados o menos, de Castan).

En una forma de realización adicional, se organizan múltiples elementos de sellado que consisten en una pieza con, por ejemplo, 20 cavidades individuales (forma de canal), en una membrana.

Mediante esta configuración, el dispositivo según la invención es capaz de absorber muestras líquidas que contienen células, tal como, por ejemplo, sangre completa, sin filtrar por ello las células. Además, el elemento de sellado permite que se apliquen grandes volúmenes de muestra a la membrana porosa (zona de trabajo) sin que se inunde. Por tanto, el elemento de sellado apoya el uso de las propiedades de absorción de la membrana porosa. Además, el elemento de sellado garantiza un flujo de la muestra direccional. Sin embargo, el dispositivo según la invención, puede funcionar bien con o sin un elemento de sellado.

Para la región de absorción (almohadilla de absorción) del dispositivo según la invención, son preferidos materiales mecánicamente estables, preferiblemente con capacidades de absorción de agua de 20-30 g/100 cm² (por ejemplo, Millipore). El contacto entre la almohadilla de absorción y la membrana de flujo lateral del dispositivo según la invención se produce mediante presión y solapamiento con la membrana porosa. La colocación precisa de la almohadilla de

absorción en la membrana se logra por adhesión de la almohadilla de absorción con la lámina de soporte que porta la membrana de flujo lateral.

En una forma de realización adicional, los componentes del dispositivo según la invención se aplican a un sustrato o lámina de soporte para el fin de refuerzo mecánico. Sin embargo, el dispositivo según la invención puede funcionar con o sin lámina de soporte. Se prefieren materiales mecánicamente estables y que no absorban agua, preferiblemente con espesores de material de 100 gm o más, que están recubiertos en un lado o ambos lados con una película adhesiva, por ejemplo, un adhesivo de acrilato sensible a la presión o autoadhesivo (por ejemplo, poliéster 0,005" W/G-187, G & L). La membrana porosa y la almohadilla de absorción se fijan a la lámina de soporte. En el caso de una lámina de soporte adhesiva en ambos lados, el segundo lado adhesivo se usa para fijar la pila a superficies adicionales, por ejemplo, dentro de la carcasa de flujo lateral.

En una forma de realización adicional, el dispositivo según la invención, ya sea con o sin lámina de soporte a la que se aplican los componentes del dispositivo según la invención, está integrado en una carcasa, mediante lo cual los componentes de la membrana se presionan entre sí y la carcasa apoya la función del elemento de sellado. Sin embargo, el dispositivo según la invención puede funcionar en cualquier caso igualmente bien con o sin carcasa.

Métodos de determinación

El método se lleva a cabo aplicando una muestra líquida. La muestra líquida preferiblemente consiste en sangre o constituyentes de sangre, en particular preferiblemente en sangre completa, concentrado de eritrocitos, sangre coagulada o líquido de prueba, tal como sangre control. La muestra se puede diluir en este caso con un tampón antes de ser aplicada.

A continuación, la invención se explicara en más detalle por medio de las figuras y ejemplos, sin estar limitada a los mismos.

En la figura 1 se muestra una representación perspectiva ejemplar de un dispositivo según la invención para pruebas de flujo lateral para la determinación simultánea de antígenos de grupo sanguíneo. En el presente ejemplo, el dispositivo consiste en una lámina de refuerzo 1, la membrana porosa 2, la almohadilla de absorción 3 y el elemento de sellado 4 bidimensional, realizado en forma de red o tridimensional realizado en forma de canal. La membrana porosa 2 está fijada de esta manera a la lámina de refuerzo 1 provista con un adhesivo de acrilato sensible a la presión o autoadhesivo. Asimismo, la almohadilla de absorción 3 está fijada a la lámina de refuerzo 1, en donde una parte de la almohadilla de absorción 3 se solapa con la membrana porosa 2. El elemento de sellado 4 fijado al lado superior de la membrana porosa 2 separa la zona de trabajo 5 del resto de la superficie de membrana y permite la distribución direccional del líquido de muestra y reactivos de prueba en la membrana porosa 2. Entre la zona de trabajo 5 y la región de la membrana porosa 2 que está en contacto con la almohadilla de absorción 3, se organiza la región de la zona indicadora 6.

En la figura 2 se muestra una determinación simultánea con éxito de los antígenos de grupo sanguíneo Jka, Jkb, Fya, Fyb, S, s, k y P1. El donante es Jka-Jkb+Fya-Fyb+S-s+k+P1+. En este caso la muestra se aplicó a la zona de trabajo situada en el medio. La muestra fluye a través de tanto las zonas indicadoras situadas a la izquierda de la zona de trabajo como las zonas indicadoras situadas a la derecha de la zona de trabajo.

En la figura 3 se muestra una comparación de, por un lado, el método según la invención con un primer anticuerpo IgG dirigido contra los antígenos de grupo sanguíneo D, Fya o k, y un segundo anticuerpo anti-IgG dirigido contra este primer anticuerpo y, por otra parte, un método comparativo sin el segundo anticuerpo. En la parte derecha, se aplica anti-IgG tres veces como un control negativo adicional. La figura 3a muestra el plan de aplicación usado en este caso. Las figuras 3b a 3e muestran los resultados experimentales que se obtuvieron usando muestras de diferentes donantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Determinación de grupos sanguíneos

Producción de las tiras de reactivas:

Las tiras reactivas consisten en una zona de trabajo localizada en mitad de la membrana, así como dos regiones de zonas indicadoras y dos regiones de absorción a distancias iguales en ambos lados de la zona de trabajo central. Las membranas del tipo Millipore HiFlow Plus 065 se recortan en tiras de un tamaño de 19 x 48 mm (ancho/largo; x/y) para un diseño de 8 a 10 bandas y se pegan a una lámina de refuerzo (por ejemplo, de G&L). Dos almohadillas de absorción (Millipore) que miden 19 x 17 mm y que se solapan con la membrana en 7 mm se pegan a los extremos de la membrana distales a la zona de trabajo. En dos filas lineales desplazadas se aplican bandas de 6 mm de largo (cada una 0,6 µl) de soluciones de diferentes anticuerpos específicos de grupos sanguíneos a las regiones de las zonas indicadoras usando un dispensador, por ejemplo, AD3200 (Biodot):

anti-Jka: clon P3HT7 (Diagast, ref. 78003); anti-Jkb: clon P3 143 (Diagast, ref. 78004); anti-Fya: clon P3TIM + anti-IgG clon MS278 (Merck Millipore, VL+JZ); anti-Fyb: clon SpA264LBg1 (Merck Millipore, FF); anti-S: clon P3S13JS123 + anti-IgG clon MS278 (Diagast, ref. 78007 + Merck Millipore, JZ); anti-s: clon P3BER (Merck Millipore, FE); anti-P1: clon P3MON2 (Merck Millipore, VN); anti-k: clon P3A1180L67 + anti-IgG clon MS278 (Merck Millipore, FA+JZ). Todos los anticuerpos se concentran aproximadamente 10 veces antes de la formulación.

El anticuerpo anti-Jka se coloca a la izquierda de la zona de trabajo en posición $x=3$ mm/ $y=9$ mm a $y=15$. Otros tres anticuerpos (anti-Jkb, anti-Fya y anti-Fyb) se dispensan iterativamente a intervalos de $x=2,5$ mm en paralelo con la posición del anticuerpo anti-Jka. El anticuerpo anti-S se coloca a la derecha de la zona de trabajo en posición $x=3$ mm/ $y=34$ mm a $y=40$. Otros tres anticuerpos (anti-s, anti-k and y-P1) se dispensan iterativamente a intervalos de $x=2,5$ mm respecto a la posición del anticuerpo anti-S.

El anticuerpo de validación anti-eritrocito específico (Val = control de proceso; fracción IgG de conejo de anti-RBC humano, Rockland, 209-4139) se aplica como un punto en $x=2,5$ mm/ $y=3$ mm desplazado respecto a la última banda de la serie de anticuerpos específicos de grupo sanguíneo. El punto control (Ctl = control negativo; contiene todos los constituyentes de varias formulaciones de anticuerpos con la excepción del anticuerpo) se aplica en $y=3$ mm desplazado respecto al punto Val. Todas las soluciones de anticuerpo contienen BSA al 1% y solución de APP3 al 9,4% [D(+)-trehalosa dihidrato al 32,4% (p/v), Genapol PF10 al 0,055% (v/v), metanol al 21,8% (v/v), tampón PPB: tampón fosfato de potasio 15 mM/NaCl 10 mM/Na₃ al 0,05% (p/v)]. Los anticuerpos se diluyen en tampón Tris/HCl 0,07 M, pH 7, con la excepción de anti-P1 que se diluye en tampón citrato 0,01 M pH 4, como sigue: anti-Jka 1:5, anti-Jkb 1:5, anti-Fya 1:5 + anti-IgG 1:25, anti-S 1:5 + 1:100, anti-s (small) 1:16,7, anti-k 1:10 + anti-IgG 1:100, anti-P1 1:10 y anti-RBC 1:10. Después de haber dispensado los anticuerpos, las membranas se secan durante 1 hora a 45°C y se sueldan junto con un elemento de sellado en carcasa de policarbonato (Medion Grifols Diagnostics AG).

Organización de la prueba:

Las muestras de sangre se pueden tomar en tubos con anticoagulantes convencionales (por ejemplo, EDTA, CPDA-1, ACD, citrato) o en forma nativa.

En un tubo de ensayo, 1 gota (50 µl) de sangre completa anticoagulada se mezcla con 4 gotas (200 µl) de diluyente F (Medion Grifols Diagnostics) o 1 gota de sedimento de eritrocitos se mezcla con 8 gotas (400 µl) de diluyente F o 2 gotas (100 µl) de células de sangre coagulada se mezclan con 2 gotas de diluyente F.

Dos gotas (100 µl) de la suspensión resultante se aplican en la zona de trabajo de la configuración de prueba descrita. Después de 30 segundos, se aplican 6 gotas (300 µl) de diluyente F en la zona de trabajo. Después de 5 minutos, los resultados se leen y registran.

Resultados:

La prueba es válida si el punto de validación anti-RBC (val) muestra una señal claramente positiva (punto rojo) y el punto control (ctl) indica un resultado negativo. La presencia de una banda roja indica que la muestra de sangre ensayada es positiva para la característica de grupo sanguíneo particular. La ausencia de una banda en la posición correspondiente en la zona de trabajo significa que la muestra de sangre ensayada es negativa para la característica de grupo sanguíneo particular.

La figura 2 muestra una determinación simultánea con éxito de los antígenos de grupo sanguíneo Jka, Jkb, Fya, Fyb, S, s, k y P1. El donante es Jka-Jkb-Fya-Fyb+S-s+k+P1+.

Ejemplo 2: Determinación de grupos sanguíneos con el método según la invención y ejemplo comparativo

La tira reactiva se produjo de forma análoga al ejemplo 1. Como anticuerpos se usaron: anti-D, clon ESD-1 (Alba), IgG humana; anti-k (cellano), clon P3A1180L67 (Millipore), IgG humana; anti-Fya, clon P3TIM (Millipore), IgG humana, y como el segundo anticuerpo: anti-IgG, clon MS278 (Millipore), IgM de ratón.

La figura 3a muestra el plan de aplicación usado. Las figuras 3b a 3e muestran los resultados experimentales que se obtuvieron con muestras de diferentes donantes. Se puede ver claramente que solo la determinación con un primer anticuerpo de clase IgG dirigido contra el antígeno de grupo sanguíneo y un segundo anticuerpo dirigido contra ese produce una banda claramente detectable, mientras que la determinación mediante el uso del primer anticuerpo de la clase IgG no produce una banda claramente reconocible. En el lado derecho, se aplica anti-IgG tres veces como un control negativo adicional. Las figuras 3b a 3e muestran que no se obtuvo banda en el caso de este control negativo.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para determinar un antígeno de grupo sanguíneo en una muestra líquida, que comprende una matriz de separación que tiene al menos una zona indicadora, **caracterizado en que** la zona indicadora comprende un primer anticuerpo dirigido contra el antígeno de grupo sanguíneo, o un fragmento del mismo, y un elemento de unión dirigido contra el primer anticuerpo, en donde el primer anticuerpo es un anticuerpo incompleto.
2. Dispositivo según la reivindicación 1, que comprende una membrana (2) que tiene una zona de trabajo (5) para aplicar la muestra líquida, al menos una zona indicadora que es capaz de interaccionar con el antígeno de grupo sanguíneo, y al menos una región de absorción (3) que absorbe el líquido después de pasar a través de la zona indicadora, en donde la zona indicadora está colocada entre la zona de trabajo (5) y una región de absorción (3), **caracterizado en que** la zona indicadora comprende un anticuerpo dirigido contra el antígeno de grupo sanguíneo, o un fragmento del mismo, y un elemento de unión dirigido contra el primer anticuerpo, en donde el primer anticuerpo es un anticuerpo incompleto.
3. Dispositivo según la reivindicación 1, en donde el dispositivo contiene tubos llenos con material de gel.
4. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el antígeno de grupo sanguíneo se selecciona del grupo de los antígenos de grupo sanguíneo A, B, AB, D, C, E, c, e, Cw, K, k, Jka, Jkb, Fya, Fyb, M, N, S, s, P1, Kpa, Kpb, Lua, Lub, Lea, Leb, Mia, Dia, Jsa, Jsb, Coa, Cob, Wra y Xga.
5. Dispositivo según la reivindicación 4, en donde el antígeno de grupo sanguíneo se selecciona del grupo de antígenos de grupo sanguíneo k, S, Fya, Kpa, Kpb, Mia, Lua, Lub, Dia, Jsa, Jsb, Coa, Cob, Wra y Xga.
6. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el primer anticuerpo es un anticuerpo de tipo IgG o IgA, preferiblemente de tipo IgG.
7. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el elemento de unión dirigido contra el primer anticuerpo se selecciona de un anticuerpo dirigido contra el primer anticuerpo, o un fragmento del mismo, y una lectina o un fragmento de la misma.
8. Dispositivo según la reivindicación 7, en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-IgG o anti-IgA, preferiblemente un anticuerpo anti-IgG monoclonal de la clase IgM, o la lectina es proteína A o proteína G.
9. Dispositivo para la determinación simultánea de un primer y un segundo antígeno de grupo sanguíneo en una muestra líquida, que comprende una membrana (2) que tiene una zona de trabajo (5) para aplicar la muestra líquida, al menos dos zonas indicadoras que son capaces de interaccionar con los antígenos de grupo sanguíneo, y al menos una región de absorción (3) que absorbe el líquido después de pasar a través de la zona indicadora, en donde las zonas indicadoras están colocadas entre la zona de trabajo (5) y la al menos una región de absorción (3), **caracterizado en que** (i) la primera zona indicadora comprende un primer anticuerpo dirigido contra el primer antígeno de grupo sanguíneo, o un fragmento del mismo, y un elemento de unión dirigido contra el primer anticuerpo, en donde el primer anticuerpo es un anticuerpo incompleto, y
(ii) la segunda zona indicadora (a) comprende un primer anticuerpo dirigido contra el segundo antígeno de grupo sanguíneo, en donde el primer anticuerpo es un anticuerpo completo; o (b) comprende un primer anticuerpo dirigido contra el segundo antígeno de grupo sanguíneo, en donde el primer anticuerpo es incompleto, y un elemento de unión dirigido contra dicho anticuerpo.
10. Dispositivo según la reivindicación 9, en donde el primer antígeno de grupo sanguíneo se selecciona de los antígenos de grupo sanguíneo k, Fya, Kpa, Kpb, Lua, Lub, Mia, Dia, Jsa, Jsb, Coa, Cob, Wra, Xga y S y el segundo antígeno de grupo sanguíneo se selecciona de A, B, AB, D, C, E, c, e, Cw, K, Lea, Leb, Jka, Jkb, Fyb, P1 y s.
11. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, en donde el primer anticuerpo en la primera zona indicadora (i) y/o el primer anticuerpo en la segunda zona indicadora (ii) es un anticuerpo de tipo IgG o IgA, preferiblemente del tipo IgG.
12. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde el elemento de unión dirigido contra el primer anticuerpo en la primera zona indicadora (i) y/o en la segunda zona indicadora (ii) se selecciona de un anticuerpo dirigido contra el primer anticuerpo, o un fragmento del mismo, y una lectina o un fragmento de la misma.
13. Dispositivo según la reivindicación 12, en donde el elemento de unión es un anticuerpo anti-IgG o anti-IgA, o la lectina es proteína A o proteína G.

14. Dispositivo según la reivindicación 13, en donde el elemento de unión en la primera zona indicadora (i) y/o el segundo anticuerpo en la segunda zona indicadora (ii) es un anticuerpo IgM o IgG.
- 5 15. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en donde el primer anticuerpo dirigido contra el primer antígeno de grupo sanguíneo y el elemento de unión dirigido contra el primer anticuerpo en la primera zona indicadora (i) y/o el primer anticuerpo dirigido contra el segundo antígeno de grupo sanguíneo y el segundo elemento de unión dirigido contra el primer anticuerpo en la segunda zona indicadora (ii) son anticuerpos IgG.
- 10 16. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, en donde la segunda zona indicadora (ii) comprende un anticuerpo IgM dirigido contra el segundo antígeno de grupo sanguíneo.
- 15 17. Método para producir un dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende aplicar un primer anticuerpo dirigido contra un antígeno de grupo sanguíneo, o un fragmento del mismo, y un elemento de unión dirigido contra el primer anticuerpo en la zona indicadora, en donde el primer anticuerpo es un anticuerpo incompleto.
- 20 18. Método para producir un dispositivo según la reivindicación 17, en donde el primer anticuerpo y el elemento de unión se aplican separados uno de otro o como una mezcla.
- 25 19. Método para determinar al menos un antígeno de grupo sanguíneo, que comprende aplicar la muestra a la zona de trabajo (5) de una membrana (2) del dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1 a 16, en donde dicha muestra está presente en una cantidad suficiente para producir que el líquido de muestra fluya a través de las zonas indicadoras hacia la región de absorción (3) y producir que los antígenos de grupo sanguíneo en el líquido de muestra formen un complejo en las zonas indicadoras.
- 30 20. Método según la reivindicación 19, en donde el método no comprende incubar el antígeno de grupo sanguíneo con un anticuerpo antes de aplicar el antígeno de grupo sanguíneo a la membrana.
- 35 21. Método según las reivindicaciones 19 o 20, en donde la muestra líquida consiste en sangre o componentes sanguíneos, preferiblemente en sangre completa, concentrado de eritrocitos, sangre coagulada o líquido de prueba, tal como sangre control.
22. Uso del dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o 9 a 16 para analizar sangre, en particular para determinar antígenos de grupo sanguíneo o epítomos antigénicos.
23. Uso según la reivindicación 22, en donde los antígenos de grupo sanguíneo o epítomos antigénicos se seleccionan del grupo de antígenos o epítomos antigénicos de grupo sanguíneo A, B, AB, D, C, E, c, e, Cw, K, k, Jka, Jkb, Fya, Fyb, M, N, S, s, P1, Kpa, Kpb, Lua, Lub, Lea, Leb, Mia, Dia, Jsa, Js b, Coa, Cob, Wra y/o Xga.

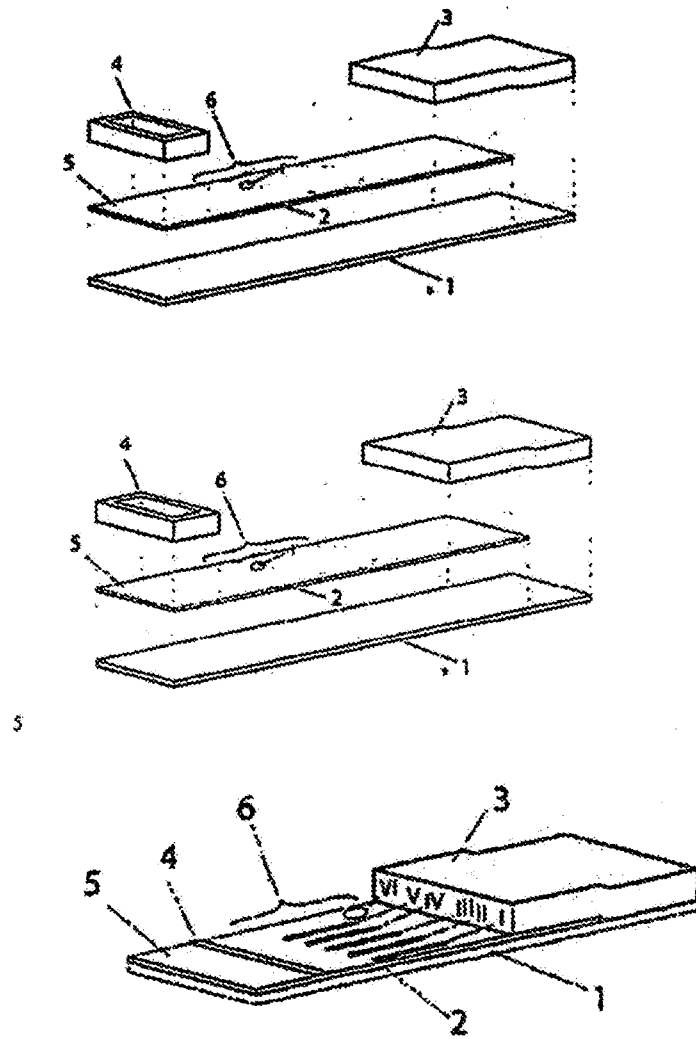


Fig. 1

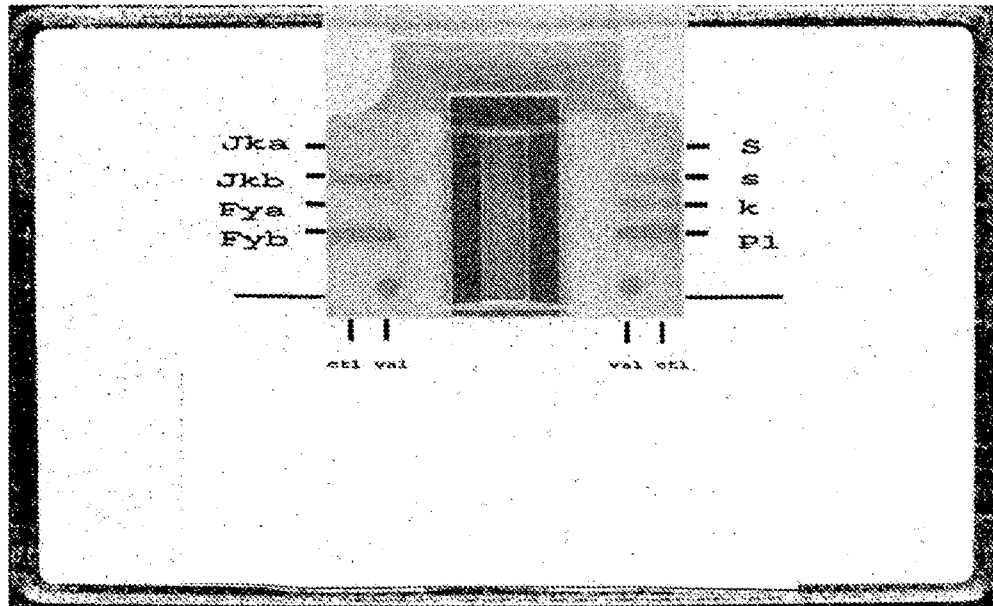


Fig. 2

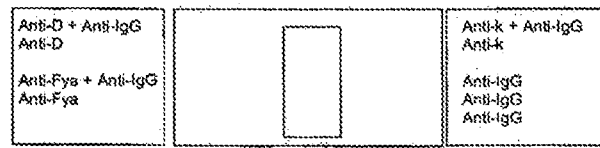


Fig. 3A

