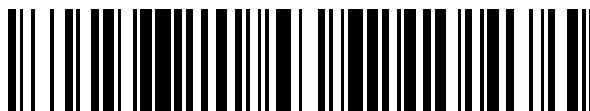


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 880 733**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.05.2016** **PCT/JP2016/064961**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2016** **WO16186188**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2016** **E 16796581 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.06.2021** **EP 3299815**

54 Título: **Tira de ensayo inmunocromatográfica y método de inmunocromatografía que usa la misma**

30 Prioridad:

21.05.2015 JP 2015103810

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

25.11.2021

73 Titular/es:

DENKA COMPANY LIMITED (100.0%)
1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome, Chuo-ku
Tokyo, JP

72 Inventor/es:

KOHIYAMA, RISA;
ISHIKAWA, OSAMU;
SHINOHARA, YUKI y
MIYAZAWA, TAKASHI

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 880 733 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

Tira de ensayo inmunocromatográfica y método de inmunocromatografía que usa la misma

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una tira de ensayo inmunocromatográfica mediante la cual se reducen las influencias de las sustancias interferentes contenidas en las muestras de ensayo y a un método de inmunocromatografía que usa la misma.

10 Antecedentes de la técnica

Entre los ensayos clínicos, hay muchos inmunoensayos cuyas muestras de ensayo son muestras biológicas, y se sabe que existen sustancias interferentes en las muestras biológicas, que influyen en las reacciones con los ligandos que se unen a las sustancias de ensayo. Para reducir la influencia de las sustancias interferentes, se ha indicado que usa un tensioactivo iónico que tiene un peso molecular de 1.000 a 100.000 (documento de patente 1).

La influencia de las sustancias interferentes puede verse como falso negativo o falso positivo en los diagnósticos rápidos que utilizan la inmunocromatografía como principio. Muchos de los diagnósticos rápidos que utilizan la inmunocromatografía como principio se utilizan ampliamente como medio para detectar de forma rápida y sencilla enfermedades infecciosas por virus o bacterias, y para determinar la política de la terapia. El falso positivo o falso negativo mencionado anteriormente que ocurre en los diagnósticos rápidos que usan inmunocromatografía como principio puede estimular una terapia incorrecta, ralentizar la terapia e incluso puede provocar la muerte.

Especialmente, los falsos negativos impiden un diagnóstico y una terapia precisos, de modo que son problemas muy grandes. Para evitar falsos positivos y falsos negativos, se ha notificado un método en el que la muestra de ensayo se trata con un líquido de tratamiento de la muestra de ensayo que contiene un compuesto que tiene dos o más grupos sulfato (Documento de patente 2)

Adicionalmente, el poli(4-estireno sulfonato de sodio) se usa como agente neutralizante para reducir la influencia de sustancias interferentes en un dispositivo de ensayo de cromatografía (documento de patente 3).

En el documento de patente 4, una tira de inmunocromatografía con sensibilidad mejorada incluía ácido poliestireno sulfónico. El uso de sal de ácido anetol sulfónico y sal de ácido poliestireno sulfónico como agente neutralizante para reducir la influencia de las sustancias interferentes en los inmunoensayos, tales como, entre otros, los métodos de tipo sándwich de inmunocromatografía se desveló en el Documento de patente 5.

Referencias de la técnica anterior**40 Documentos de patente**

Documento de patente 1: JP 2005-241415 A
Documento de patente 2: JP 2014-149189 A
Documento de patente 3: US 2001/006823 A1
Documento de patente 4: JP 2001-133456 A
Documento de patente 5: EP 1724582 A2

Sumario de la invención**50 Problemas a resolver mediante la invención**

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una tira de ensayo inmunocromatográfica mediante la cual se reducen las influencias de las sustancias interferentes en el método de inmunocromatografía, contenidas en las muestras de ensayo, de modo que permita medir de forma precisa y específica una sustancia de ensayo en una muestra de ensayo con independencia de la cantidad de la muestra de ensayo suministrada al ensayo y proporcionar un método de inmunocromatografía que use la tira de ensayo inmunocromatográfica.

Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores estudiaron de forma exhaustiva para descubrir que una sustancia de ensayo en una muestra de ensayo se puede medir de forma precisa y específica reduciendo las influencias de las sustancias interferentes, impregnando uno o más polímeros en los que el o los monómeros cíclicos hidrofóbicos que tienen uno o más grupos funcionales iónicos se polimerizan en uno o más sitios específicos en la tira de ensayo inmunocromatográfica, para completar la presente invención.

Es decir, la presente invención proporciona una tira de ensayo inmunocromatográfica que se define en las

reivindicaciones y comprende en el orden desde aguas arriba, una almohadilla de muestra, una región de sustancia marcada, una región de detección y una banda de absorción, en donde uno o más polímeros en los que se polimerizan uno o más monómeros cíclicos hidrofóbicos que tienen uno o más grupos funcionales iónicos se impregnan junto con una o más sales inorgánicas en una región aguas arriba de la región de la sustancia marcada.

La presente invención proporciona un método de inmunocromatografía que comprende el uso de la tira de ensayo inmunocromatográfica de acuerdo con la presente invención.

Efectos de la invención

Mediante el tira de ensayo inmunocromatográfica de la presente invención, se reducen las influencias de las sustancias interferentes, de modo que permite medir de forma precisa y específica una sustancia de ensayo en una muestra de ensayo con independencia de la cantidad de la muestra de ensayo suministrada al ensayo.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una vista esquemática que muestra la estructura de una tira de ensayo inmunocromatográfica típica.

Modo para llevar a cabo la invención

La presente invención se refiere a una tira de ensayo inmunocromatográfica mediante la cual se evitan los falsos positivos y los falsos negativos, especialmente los falsos negativos, y se puede conseguir una medición precisa de la sustancia de ensayo. En este punto, falso positivo significa que se genera una señal positiva en un ensayo a pesar del hecho de que una sustancia de ensayo no está contenida en una muestra de ensayo, y falso negativo significa que no se genera una señal positiva en un ensayo a pesar del hecho de que una sustancia de ensayo está contenida en una muestra de ensayo. Por ejemplo, en los métodos inmunocromatográficos (métodos de inmunocromatografía), cuando la sustancia de ensayo está contenida en la muestra de ensayo, se forma un complejo de sustancia inmovilizada-sustancia de ensayo-reactivo de marcaje sobre un soporte sólido, y se genera la señal de la sustancia de marcaje del complejo, mientras que en el falso negativo, se inhibe la generación de la señal por la razón de que no se forma el complejo o similar.

La tira de ensayo inmunocromatográfica comprende un soporte que tiene una región de detección en la que se inmoviliza un anticuerpo (anticuerpo 1) que captura una diana a medir (antígeno o similar), una región de sustancia marcada que tiene un anticuerpo marcado móvil (anticuerpo 2), una almohadilla de muestra a la que se añade una muestra gota a gota, una banda de absorción que absorbe el líquido de muestra desarrollado y una lámina de refuerzo para unir estos miembros.

El número de las regiones de detección y el tipo de los anticuerpos marcados incluidos en la región de sustancia marcada no se limita a 1. Usando los anticuerpos correspondientes a una pluralidad de las dianas a medir, se pueden medir con la misma tira de ensayo dos o más tipos de antígenos.

La Figura 1 muestra una realización preferida de una tira de ensayo inmunocromatográfica típica. Cabe destacar que la tira de ensayo inmunocromatográfica no se limita a la mostrada en la figura 1. En la figura 1, el número de referencia 1 indica un soporte, el número de referencia 2 indica una región de sustancia marcada, el número de referencia 3 indica una región de detección, el número de referencia 4 indica una almohadilla de muestra, el número de referencia 5 indica una banda de absorción y el número de referencia 6 indica una lámina de refuerzo.

La figura superior de la figura 1 es una vista superior y la figura inferior es una vista en sección transversal. En el ejemplo que se muestra en las figuras, el soporte en el que se forman dos regiones de detección, la banda de absorción, la región de la sustancia marcada y la almohadilla de muestra se laminan cada una en la lámina de refuerzo. Como se muestra en las figuras, un extremo de la banda de absorción y un extremo del soporte, el otro extremo del soporte y un extremo de la región de sustancia marcada y el otro extremo de la región de sustancia marcada y un extremo de la almohadilla de muestra se superponen respecto de cada uno de modo que se forma un paso de flujo lateral continuo.

El soporte es un material capaz de inmovilizar un anticuerpo para capturar una sustancia de ensayo (antígeno) y tiene un rendimiento que no impide que un líquido pase en dirección horizontal. Preferentemente, el soporte es una película fina porosa de acción capilar y es un material capaz de transportar un líquido y los componentes dispersos en el mismo por absorción. El material que forma el soporte no está particularmente limitado y los ejemplos del mismo incluyen celulosa, nitrocelulosa, acetato de celulosa, difluoruro de polivinilideno (PVDF), fibra de vidrio, nailon, policetona y similares. Entre ellos, es más preferible una película fina de nitrocelulosa.

La región de la sustancia marcada está hecha de un material base poroso que contiene un anticuerpo marcado y se pueden usar una fibra de vidrio, una tela no tejida o similar generalmente utilizada como material del material base. Para impregnar una gran cantidad del anticuerpo marcado, el material base tiene, preferentemente, la forma de una almohadilla que tiene un grosor de aproximadamente 0,3 mm a 0,6 mm.

La región de detección se refiere a una parte del soporte sobre el que se inmoviliza el anticuerpo que captura la sustancia de ensayo (antígeno). La región de detección tiene al menos una región en la que se inmoviliza el anticuerpo para capturar el antígeno.

5 La almohadilla de muestra es un sitio para dejar caer un espécimen o una muestra preparada usando un espécimen y es un material poroso que tiene una propiedad de absorción de agua. Como material se pueden usar celulosa de uso habitual, fibra de vidrio, tela no tejida o similar. Para utilizar una gran cantidad de muestra en el inmunoensayo, el material tiene, preferentemente, la forma de una almohadilla que tiene un grosor de aproximadamente 0,3 mm a 1 mm.

10 La almohadilla de muestra y la región de sustancia marcada mencionada anteriormente son meras distinciones funcionales y no es necesario que estén hechas de materiales distintos. Es decir, también es posible que un área parcial del material establecido como almohadilla de muestra tenga la función de la región de sustancia marcada.

15 La banda de absorción es un miembro para absorber componentes que se suministran al soporte y no participan en la reacción en las regiones de detección. Como material, se puede usar un papel de filtro, una esponja o similar que tenga una alta capacidad de retención de agua, hecha de un compuesto polimérico natural general, polímero sintético o similares, pero para promover el desarrollo de la muestra, es preferible uno que tenga una alta capacidad de absorción de agua.

20 La lámina de refuerzo es un miembro para unir y fijar todos los materiales mencionados anteriormente, es decir, el soporte, la almohadilla de muestra, la región de la sustancia marcada y la banda de absorción con una superposición parcial. La lámina de refuerzo no siempre es necesaria siempre que estos materiales se puedan disponer y fijar a intervalos óptimos, pero en general es preferible usar la lámina de refuerzo en vista de la conveniencia de fabricación y uso.

25 En la tira de ensayo de la realización descrita con referencia a la figura 1, la muestra pasa a través de un paso de flujo poroso formado por una serie de conexiones de la almohadilla de muestra, la región de la sustancia marcada, el soporte, las regiones de detección y la banda de absorción. Por lo tanto, en la presente realización, todos ellos son muestras de regiones móviles. Dependiendo de la calidad y la forma de cada material constituyente, puede haber un modo en el que la muestra no penetre en el interior del material sino que atraviese la interfaz. Sin embargo, dado que no importa si la región de movimiento de la muestra definida en la presente memoria descriptiva está en el interior o en la interfaz del material, una tira de ensayo en tal modo también se incluye dentro del alcance de la presente memoria descriptiva.

30

35 En la tira de ensayo inmunocromatográfica de la presente invención, uno o más polímeros en los que se polimerizan uno o más monómeros cíclicos hidrofóbicos que tienen uno o más grupos funcionales iónicos como se representan en las reivindicaciones mediante la Fórmula (II) o (V) se impregna o impregnan junto con una sal inorgánica en una región o regiones aguas arriba de la región de la sustancia marcada (aguas arriba a lo largo del flujo de la muestra de ensayo), es decir, dentro de la almohadilla de muestra o entre la almohadilla de muestra y la región de la sustancia marcada. Mediante esto, la sustancia de ensayo en la muestra de ensayo se puede medir de manera precisa y específica independientemente de la cantidad de muestra de ensayo suministrada al ensayo.

40

45 El uno o más polímeros pueden estar impregnados en la almohadilla de muestra o en un material poroso distinto de la almohadilla de muestra y el material poroso puede disponerse entre la almohadilla de muestra y la región de sustancia marcada.

El polímero en el que se polimerizan uno o más monómeros cíclicos hidrofóbicos que tienen uno o más grupos funcionales iónicos tiene las siguientes características.

50 El uno o más grupos funcionales iónicos pueden ser uno o más grupos funcionales aniónicos o uno o más grupos funcionales catiónicos. Los ejemplos del grupo funcional iónico incluyen el grupo sulfónico y sales del mismo, grupo carboxilo y sales del mismo, y aminas (amina cuaternaria o similar que se ioniza en solución acuosa). Se prefieren especialmente el grupo sulfónico y sus sales.

55 Los ejemplos del anillo hidrofóbico incluyen anillos aromáticos y anillos cicloalquilo. El anillo hidrofóbico puede ser un heteroanillo que contiene uno o más átomos de oxígeno, uno o más átomos de nitrógeno, uno o más átomos de azufre y/o similares, o puede ser un anillo condensado resultante de la fusión de los heteroanillos. Como anillo hidrofóbico, se prefieren los anillos aromáticos. Los ejemplos de anillos aromáticos incluyen anillo de benceno, anillo de naftaleno y anillo de antraceno. Entre estos anillos, se prefieren el anillo de benceno y el anillo de naftaleno, y el anillo de benceno es el más preferido.

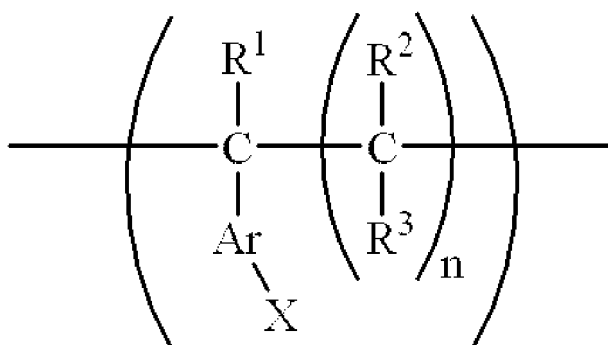
60

Los ejemplos de polímero preferido usado en la presente invención incluyen polianetol sulfonato de sodio, poliestireno sulfonato de sodio (PS-1, PS-5, PS-50 y PS-100 (nombres comerciales, producidos por Tosoh Corporation), sal sódica de condensado entre ácido naftalenosulfónico y formalina, sal sódica de condensado entre un ácido sulfónico aromático y formalina (más concretamente, DISROL (nombre comercial, producido por Nippon Nyukazai Co., Ltd.), DEMOL (nombre comercial, producido por Kao Corporation), POLITY PS-1900 (nombre comercial, producido por Lion

65

Corporation) y POLITY N-100K (nombre comercial, producido por Lion Corporation).

Los ejemplos de los polímeros preferidos usados en la presente divulgación incluyen aquellos que contienen una unidad o unidades recurrentes representadas por la siguiente Fórmula [I]:

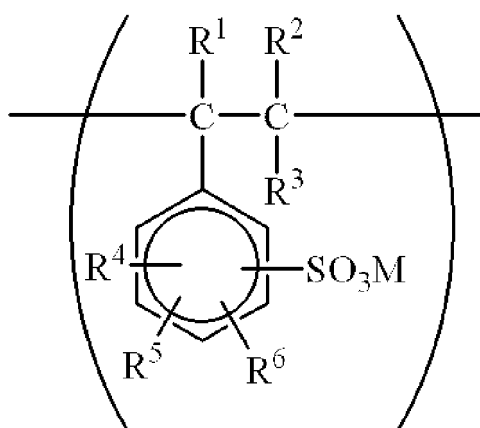


[I]

en donde Ar representa un anillo hidrofóbico; X representa el grupo funcional iónico; R¹ a R³ representan independientemente hidrógeno o alquilo; n representa un número entero de 0 a 10; el uno o más átomos de hidrógeno unidos a uno o más átomos de carbono que constituyen Ar está opcionalmente sustituido con un sustituyente o sustituyentes que no afectan adversamente al efecto de la presente divulgación.

En la fórmula [I] descrita anteriormente, X y Ar representan el grupo funcional iónico y el anillo hidrófobo descritos anteriormente, respectivamente. En los casos en los que R¹ a R³ son grupos alquilo, los grupos alquilo son, preferentemente, grupos alquilo inferior (C₁-C₄, lo mismo se aplica a la descripción siguiente). De forma adicional, n es, preferentemente, de 0 a 3. El uno o más átomos de hidrógeno unidos a uno o más átomos de carbono que constituyen Ar pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes que no afectan adversamente al efecto de la presente invención. Los ejemplos de tal sustituyente incluyen grupos alquilo inferior y grupos alcoxi inferior.

Entre las unidades recurrentes representadas por la Fórmula [I], en la presente invención se usan las representadas por la siguiente Fórmula [II]:

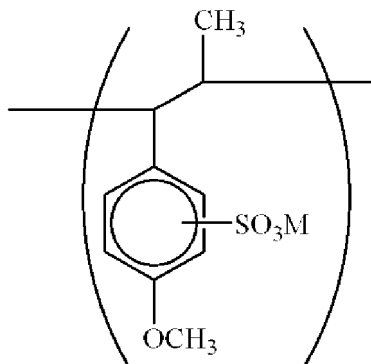


[II]

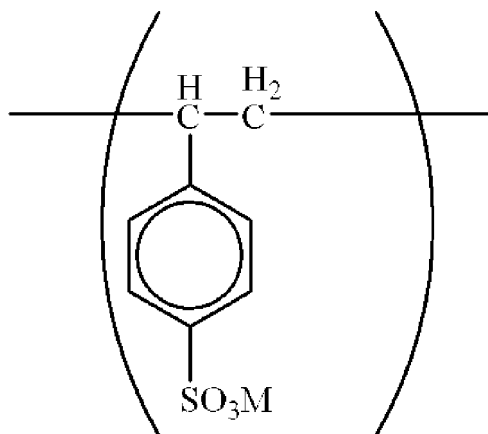
en donde M representa un átomo o un grupo que se convierte en un catión monovalente en solución acuosa, preferentemente un metal alcalino, tal como sodio o potasio; R¹ a R³ representan independientemente hidrógeno o alquilo; y R⁴ a R⁶ representan independientemente hidrógeno, alcoxi C₁-C₄ o alquilo C₁-C₄.

Entre las unidades recurrentes representadas por la fórmula [I] descrita anteriormente, especialmente preferidas son

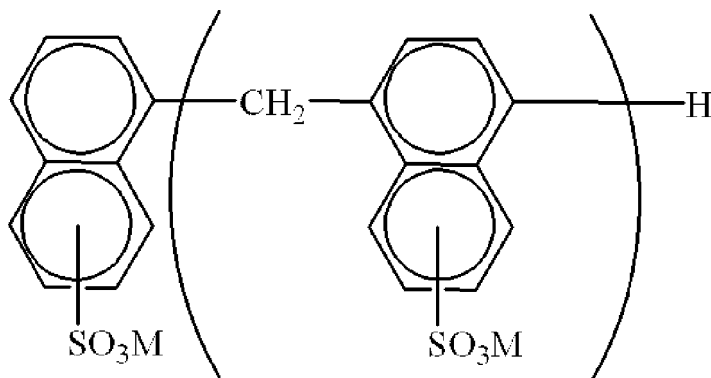
las sales de ácido anetol sulfónico representadas por la siguiente Fórmula [III], sales de ácido estireno sulfónico representadas por la siguiente fórmula [IV] y sales de condensado entre ácido naftaleno sulfónico y formalina representadas por la siguiente fórmula [V].



[III]



[IV]



[V]

en donde en las Fórmulas [III], [IV] y [V], M tiene el mismo significado que en la Fórmula [I] y es, preferentemente, un metal alcalino, tal como sodio o potasio.

El peso molecular del polímero es, preferentemente, de 1.000 a 100.000 y, más preferentemente, de 1000 a 60.000.

Las unidades recurrentes descritas anteriormente pueden emplearse individualmente o pueden emplearse dos o más de ellas en combinación. Aunque el polímero usado en la presente invención consiste preferentemente solo en la unidad o unidades recurrentes descritas anteriormente, el polímero puede comprender adicionalmente otra unidad o unidades en la medida en que el efecto de la presente invención no se vea afectado adversamente. El contenido de dicha unidad o unidades en el polímero no suele ser superior al 20 % molar, preferentemente, no más de 10 % molar, aún más preferentemente no más de 5 % molar.

La cantidad de los uno o más polímeros usados en la presente invención no está particularmente limitada y normalmente es de aproximadamente 0,01 µg a 1 mg, preferentemente de 0,1 µg a 0,1 mg por una tira de ensayo inmunocromatográfica. Se prefiere, sin embargo, para seleccionar la cantidad óptima para lograr el efecto, dependiendo del tipo de tensioactivo iónico macromolecular, el tipo de sal o sales inorgánicas utilizadas, la composición y la cantidad de la suspensión de la muestra de ensayo que se va a dejar caer, etc.

Para eliminar aún más las influencias de las sustancias interferentes, se prefiere impregnar una o más sales inorgánicas junto con el o los polímeros. Los ejemplos preferidos de la sal inorgánica incluyen, aunque sin limitación, compuestos inorgánicos solubles en agua, incluidos compuestos de sodio, compuestos de potasio, compuestos de cesio, compuestos de magnesio, compuestos de calcio y compuestos de estroncio y combinaciones de los mismos. Se prefieren cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de litio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, yoduro de sodio, bromuro de sodio y similares. Se prefieren especialmente el cloruro de sodio y cloruro de magnesio.

La cantidad de sal o sales inorgánicas usadas en la presente invención no está particularmente limitada y normalmente es de aproximadamente 0,01 µmol a 1 mmol, preferentemente de 0,1 µmol a 0,1 mmol por una tira de ensayo inmunocromatográfica. Se prefiere, sin embargo, para seleccionar la cantidad óptima para lograr el efecto, dependiendo del tipo de tensioactivo iónico macromolecular, el tipo de sal o sales inorgánicas utilizadas, la composición y la cantidad de la suspensión de la muestra de ensayo que se va a dejar caer, etc.

Según la realización de la figura 1, se describirá un método de uso de la tira de ensayo de la presente invención. La medición se inicia aplicando un espécimen o una muestra preparada usando un espécimen sobre la almohadilla de muestra. La muestra de ensayo puede tener la forma de una suspensión preparada preliminarmente o puede aplicarse un espécimen directamente a la almohadilla de muestra.

La muestra de ensayo aplicada a la almohadilla de muestra se desarrolla en la dirección horizontal secuencialmente a la región de la sustancia marcada, el soporte y la banda de absorción por capilaridad. En la región de la sustancia marcada, el anticuerpo marcado se libera en la solución y se desarrolla en el soporte junto con el desarrollo de la muestra. En los casos en que haya un antígeno en la muestra, el antígeno es capturado específicamente por un anticuerpo de captura en las regiones de detección del soporte y el antígeno también forma un complejo mediante una reacción específica con el anticuerpo marcado. De esta forma, se establece un sándwich de los anticuerpos a través del antígeno en las regiones de detección y el complejo anticuerpo-antígeno marcado puede medirse en las regiones de detección.

En el método que utiliza la tira de ensayo inmunocromatográfica de la presente invención, la muestra de ensayo entra en contacto con el o los polímeros en los que se polimerizan el o los monómeros cíclicos hidrofóbicos que tienen uno o más grupos funcionales iónicos, y contacta con el o los polímeros y la o las sales inorgánicas, durante la prueba, la muestra se desarrolla desde la almohadilla de muestra hasta la región de la sustancia marcada, de modo que se reducen las influencias de las sustancias interferentes en la muestra de ensayo.

Convencionalmente, para evitar las influencias de las sustancias interferentes en la muestra de ensayo, se añade preliminarmente un reactivo para reducir las influencias de las sustancias interferentes a un medio para formar una suspensión de ensayo y se suspende una muestra en el medio. Sin embargo, dado que el espécimen que es una muestra biológica se toma con un hisopo o similar sin cuantificación, la cantidad del espécimen varía. Como resultado, el medio para suspender el espécimen se puede diluir con una cantidad en exceso del espécimen y, en consecuencia, el reactivo para reducir las influencias de las sustancias interferentes también se puede diluir para que no se obtenga un efecto reductor suficiente, lo cual supone un problema. En la presente invención, mediante el uso de un miembro que impregna el uno o más polímeros en los que se polimerizan uno o más monómeros cíclicos hidrofóbicos que tienen uno o más grupos funcionales iónicos y se impregnan el uno o más polímeros junto con la una o más sales inorgánicas, cuyo miembro está dispuesto preliminarmente en un sitio aguas arriba de la región de la sustancia marcada y siempre aplicando una cantidad fija de la muestra de ensayo a la almohadilla de muestra, el reactivo para reducir las influencias de las sustancias interferentes no se diluye hasta el punto de perder su efecto., de modo que se pueda obtener una medición precisa y específica.

La muestra de ensayo a someter al método de la presente invención no está restringida y se prefieren las muestras biológicas con las que el efecto de la presente invención, es decir, reducir la influencia de las sustancias interferentes, se ejerce en gran medida. Los ejemplos preferidos de los mismos incluyen fluidos corporales tales como suero, plasma sanguíneo, sangre, orina, heces, saliva, fluidos tisulares, líquido cefalorraquídeo y frotis, así como sus diluciones. Especialmente, se prefieren las muestras de ensayo contaminadas con sustancias originadas en las membranas mucosas del cuerpo, esputo, saliva, frotis faríngeo, hisopo de cavidad nasal, aspirados nasales, hisopo de conjuntiva

de la córnea, especímenes de heces y similares.

En el método que utiliza la tira de ensayo inmunocromatográfica de la presente invención, la sustancia de ensayo que se va a medir es un antígeno o un anticuerpo que puede medirse mediante un inmunoensayo, es decir, mediante un ensayo que utiliza la reacción antígeno-anticuerpo. El antígeno puede ser cualquier antígeno siempre que se pueda preparar un anticuerpo contra el mismo. Los ejemplos de los mismos incluyen proteínas, polisacáridos y lípidos. También se pueden medir protozoos, hongos, bacterias, micoplasma, rickettsia, clamidia, virus y similares que contengan estos antígenos.

Ejemplos

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá más específicamente a modo de ejemplos de la misma. Sin embargo, la presente invención no está limitada por los siguientes Ejemplos.

Ejemplos 1 a 2 y Ejemplos Comparativos 1 a 4

Influencias por sustancias interferentes en la saliva y efecto de reducir las influencias por sustancias interferentes por el método convencional y por el método de la presente invención

1. Inmovilización del anticuerpo anti-*Mycoplasma pneumoniae* sobre la membrana de nitrocelulosa

Se preparó una solución en la que se diluyó un anticuerpo anti-*Mycoplasma pneumoniae* a una concentración de 1,0 mg/ml con agua purificada y se preparó un anticuerpo IgG anti-ratón. El anticuerpo anti-*Mycoplasma pneumoniae* y el anticuerpo anti-IgG de ratón se aplicaron linealmente sobre el lado de la almohadilla de muestra y el lado del cuerpo de absorción de una membrana de nitrocelulosa recubierta con una película de PET, respectivamente. Después de eso, la membrana de nitrocelulosa se secó a 45 °C durante 30 minutos para obtener una membrana inmovilizada con anticuerpo anti-*Mycoplasma pneumoniae*. En este ejemplo, esta membrana se denomina "membrana con anticuerpos inmovilizados".

2. Inmovilización de anticuerpos anti-*Mycoplasma pneumoniae* en partículas de poliestireno coloreadas

El anticuerpo anti-*Mycoplasma pneumoniae* se diluyó con agua purificada hasta una concentración de 1,0 mg/ml y se le añadieron partículas de poliestireno coloreadas hasta una concentración del 0,1 %. Después de la agitación, se añadió carbodiimida hasta una concentración del 1 % y el resultante se agitó adicionalmente. El sobrenadante se eliminó mediante centrifugación y se resuspendió en Tris 50 mM (pH 9,0), 3 % de BSA para obtener partículas de poliestireno coloreadas unidas a anticuerpos anti-*Mycoplasma pneumoniae*. En este ejemplo, estas partículas se denominan "partículas con anticuerpos inmovilizados".

3. Aplicación y secado de partículas de poliestireno coloreadas unidas a anticuerpos anti-*Mycoplasma pneumoniae*

Se aplicó una cantidad prescrita de 1,0 µg de las partículas inmovilizadas con anticuerpo preparadas en la sección 2 a una tela no tejida de fibra de vidrio y la resultante se secó a 45 °C durante 30 minutos. En este ejemplo, la tela no tejida así obtenida se denomina "almohadilla seca".

4. Preparación de componentes de impregnación de telas no tejidas para reducir los efectos de las sustancias interferentes

Cantidades prescritas de poliestirenosulfonato de sodio (peso molecular: 14.000) y NaCl se aplicaron a una tela no tejida junto con Tx100 y el resultante se secó para obtener una tela no tejida que impregna los componentes para reducir los efectos de las sustancias interferentes (por una tira de ensayo, 8 µg de poliestirenosulfonato de sodio y 40 µmol de NaCl).

5. Preparación de la tira de ensayo de *Mycoplasma pneumoniae*

La membrana con anticuerpos inmovilizados preparada en la sección 1, la almohadilla seca preparada en la sección 3 y los componentes de impregnación de telas no tejidas para reducir los efectos de las sustancias interferentes preparadas en la sección 4 se unieron a otros miembros (la lámina de refuerzo y la banda de absorción) y el resultante se cortó a un ancho de 5 mm para preparar las tiras de ensayo de *Mycoplasma pneumoniae*. En este ejemplo, la tira de ensayo que usa los componentes de impregnación de tela no tejida para reducir los efectos de las sustancias interferentes como almohadilla de muestra se denomina "tira de ensayo de la presente invención". Se preparó una tira de ensayo similar que usa un miembro al que no se aplicó nada en lugar de los componentes de impregnación de telas no tejidas para reducir los efectos de las sustancias interferentes preparadas en la sección 4 y se usó en los Ejemplos Comparativos. En este ejemplo, la tira de ensayo que utiliza la tela no tejida a la que no se aplicó nada, ya que la almohadilla de muestra se denomina "tira de ensayo del método convencional". Las tiras de ensayo incluidas, desde aguas arriba del flujo de la muestra de ensayo, una almohadilla de muestra, una almohadilla seca (región de sustancia marcada), una membrana con anticuerpos inmovilizados (región de detección) y una banda de absorción.

6. Tratamiento con saliva

Se colocó un hisopo en la boca para que el hisopo absorbiera bien la saliva y el resultante se suspendió en una solución para tratar la muestra de ensayo (Quicknavi-Sample Suspending Solution; producido por Denka Seiken Co., Ltd.) (muestra de ensayo tratada con saliva). Se colocó un hisopo en la boca para que el hisopo absorbiera bien la saliva y el resultante se suspendió en una solución para tratar la muestra de ensayo (Quicknavi-Sample Suspending Solution; producido por Denka Seiken Co., Ltd.) que contiene poliestirenosulfonato de sodio (muestra de ensayo tratada con saliva del método convencional).

7. Mediciones

A la solución para tratar la muestra de ensayo tal como está o a la muestra de ensayo tratada con saliva, se añadió y mezcló el antígeno de *Mycoplasma pneumoniae*, y cada una de las mezclas resultantes, cada una en una cantidad de 50 µl, se añadió gota a gota a la tira de ensayo de la presente invención y a la tira de ensayo del método convencional, respectivamente. Quince minutos después, se evaluó visualmente la existencia de partículas de poliestireno coloreadas depositadas en el sitio prescrito en el que se inmovilizó el anticuerpo anti-*Mycoplasma pneumoniae* y el grado de deposición. Los casos en los que el grado de deposición lineal fue fuerte se evaluaron como los casos en donde el juicio fue difícil se evaluaron como "±", y los casos en donde no se observó deposición se evaluaron como "-".

8. Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 1.

[Tabla 1]

Ejemplos		Tratamiento de saliva	Tira de ensayo	Resultado de la evaluación
Ejemplo comparativo 1	suspensión de muestra de ensayo	No	método convencional	+
Ejemplo comparativo 2	suspensión de muestra de ensayo	Sí	método convencional	-
Ejemplo 1	suspensión de muestra de ensayo	No	la invención	+
Ejemplo 2	suspensión de muestra de ensayo	Sí	la invención	+
Ejemplo comparativo 3	suspensión de muestra de ensayo + poliestirenosulfonato de sodio	No	método convencional	+
Ejemplo comparativo 4	suspensión de muestra de ensayo + poliestirenosulfonato de sodio	Sí	método convencional	±

Tal como se muestra en la Tabla 1, con la tira de ensayo convencional (que no contiene poliestirenosulfonato de sodio), el resultado del juicio fue "-" (falso negativo) para la muestra de ensayo tratada con saliva debido a las sustancias interferentes en la saliva, a pesar de que la muestra de ensayo contenía el antígeno en una cantidad que debería juzgarse como "+" (positivo) (Ejemplos comparativos 1 y 2). Incluso cuando se añadió poliestirenosulfonato de sodio a la muestra de ensayo como se describe en el Documento de patente 1, el juicio no fue claro para la muestra de ensayo tratada con saliva (ejemplo comparativo 4). Por el contrario, cuando se usó la tira de ensayo de la presente invención, se obtuvo un juicio claro independientemente de si el tratamiento con saliva se había realizado o no (Ejemplos 1 y 2). De forma adicional, en el ejemplo comparativo 2 en el que se aplicó una muestra de ensayo tratada con saliva, no se observó deposición de las partículas de poliestireno coloreadas no solo en el lugar en el que se inmovilizó el anticuerpo anti-*Mycoplasma pneumoniae*, sino también en el sitio en el que se inmovilizó el anticuerpo anti-IgG de ratón. Por otro lado, cuando se añadió poliestirenosulfonato de sodio en un sistema líquido (ejemplo comparativo 4), que es un método convencional, aunque se recuperó la deposición de las partículas en el sitio en el que se inmovilizó el anticuerpo anti-IgG de ratón, solo se observó un pequeño grado de deposición en el sitio en el que se inmovilizó el anticuerpo anti-*Mycoplasma pneumoniae*. En contraste con estos métodos convencionales, en el ejemplo 2 en el que se usó la tira de ensayo inmunocromatográfica de la presente invención (se impregnaron poliestirenosulfonato y la sal), la deposición de las partículas se confirmó fácilmente en los dos sitios en los que se inmovilizó el anticuerpo anti-IgG de ratón y en los que se inmovilizó el anticuerpo anti-*Mycoplasma pneumoniae*, respectivamente. Por tanto, es evidente que mediante el método de la presente invención, los efectos de las sustancias interferentes originadas en el organismo vivo sobre la reacción antígeno-anticuerpo se redujeron eficazmente en comparación con los métodos convencionales.

Ejemplos 11 a 17

Tipos de polímeros en los que se polimeriza un monómero cíclico hidrofóbico que tiene un grupo funcional iónico

De la misma manera que en los ejemplos 1 y 2, se prepararon tiras de ensayo que contienen cada uno de los

tensioactivos disponibles comercialmente (Tabla 2) que contienen un polímero en el que se polimeriza un monómero cíclico hidrofóbico que tiene un grupo funcional iónico, en una cantidad prescrita (40 µg/tira de ensayo). Usando estas tiras de ensayo, mediante el mismo método que en el Ejemplo 2, se examinó el efecto de reducir las influencias de las sustancias interferentes en la saliva. Los resultados se muestran en la Tabla 2. En cuanto a los pesos moleculares promedio de los distintos tensioactivos, el peso molecular promedio de PS-1 es de 10.000 a 30.000 kDa, el de PS-5 es de 50.000 a 100.000, el de POLITY PS-1900 es 16.000, el de DEMOL NL es de 3.000 a 4.000 y el de DEMOL EP es de 7.000 a 8.000.

[Tabla 2]

	Tensioactivo	Tratamiento de saliva	Tira de ensayo	Juicio
Ejemplo comparativo 2	sin impregnación	Sí	método convencional	-
Ejemplo comparativo 5	sin tensioactivo	Sí	la sal sola se impregnó	-
Ejemplo 3	PS-1 (Tosho)	Sí	la invención	+
Ejemplo 4	PS-5 (Tosho)	Sí	la invención	+
Ejemplo 5	POLITY N100K (León)	Sí	la invención	+
Ejemplo 6	POLITY PS-1900 (León)	Sí	la invención	+
Ejemplo 7	DEMOL SSL (Kao)	Sí	la invención	+
Ejemplo 8	DEMOL NL (Kao)	Sí	la invención	+
Ejemplo 9	DEMOL EP (Kao)	Sí	la invención	+
Ejemplo 10	polianetol sulfonato de sodio	Sí	la invención	+

Tal como se muestra en la Tabla 2, se observó claramente el efecto de impregnar cualquiera de los polímeros, aunque el grado del efecto varía dependiendo del tipo de polímero.

Ejemplo 3 Tipos de sales inorgánicas

De la misma manera que en los ejemplos 1 y 2, se prepararon tiras de ensayo que contenían un tensioactivo PS-1 (TOSOH) disponible comercialmente que contiene un polímero en el que se polimeriza un monómero cíclico hidrofóbico que tiene un grupo funcional iónico, en una cantidad prescrita (2 µg/tira de ensayo) y que contiene cada una de las diversas sales inorgánicas (Tabla 3) en una cantidad prescrita (4 µmol/tira de ensayo). Mediante el mismo método que en el Ejemplo 2, se examinó el efecto de reducir las influencias de las sustancias interferentes en la saliva. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

[Tabla 3]

	Sales inorgánicas	Tratamiento de saliva	Tira de ensayo	Juicio
Ejemplo comparativo 2	sin impregnación	Sí	método convencional	-
Ejemplo 11	NaCl	Sí	la invención	+
Ejemplo 12	KCl	Sí	la invención	+
Ejemplo 13	KI	Sí	la invención	+
Ejemplo 14	MgCl ₂	Sí	la invención	+
Ejemplo 15	CaCl ₂	Sí	la invención	+
Ejemplo 16	LiCl	Sí	la invención	+
Ejemplo 17	NaBr	Sí	la invención	+

Se confirmó que las influencias de las sustancias interferentes originadas en un organismo vivo en la reacción antígeno-anticuerpo se redujeron utilizando cada una de las diversas sales inorgánicas junto con el tensioactivo disponible comercialmente que contiene un polímero en el que se polimeriza un monómero cíclico hidrofóbico que tiene un grupo funcional iónico. De forma adicional, se confirmó el efecto para reducir las influencias de las sustancias interferentes para todas las sales inorgánicas, aunque el grado del efecto reductor varía dependiendo del tipo de sal inorgánica.

Ejemplo 18

Ventaja de usar un polímero en el que el monómero cíclico hidrofóbico que tiene un grupo funcional iónico se polimeriza junto con la sal inorgánica

De la misma manera que en los ejemplos 1 y 2, se prepararon tiras de ensayo que contenían un tensioactivo PS-1 (nombre comercial, TOSOH) disponible comercialmente que contiene un polímero en el que se polimeriza un monómero cíclico hidrofóbico que tiene un grupo funcional iónico, en una cantidad prescrita (Tabla 4) y que contiene cloruro sódico en una cantidad prescrita (Tabla 4). Mediante el mismo método que en el Ejemplo 2, se examinó el efecto de reducir las influencias de las sustancias interferentes en la saliva. De forma adicional, también se evaluaron los niveles de fondo (resultado de las partículas restantes en la membrana distintas de las líneas de ensayo y disminuye la facilidad de observación visual). Los resultados se muestran en las Tablas 4 y 5.

[Tabla 4]

		NaCl ($\mu\text{mol/tira de ensayo}$)			
		0	0,4	4	40
PS-1 ($\mu\text{g/tira de ensayo}$)	0	-	-	-	-
	0,8	$\pm$	+	+	+
	8	$\pm$	+	+	+
	80	+	+	+	+
*Los resultados que se muestran dentro del marco grueso son los de este ejemplo.					

[Tabla 5]

		NaCl ($\mu\text{mol/tira de ensayo}$)			
		0	0,4	4	40
PS-1 ($\mu\text{g/tira de ensayo}$)	0	baja	baja	baja	baja
	0,8	baja	baja	baja	baja
	8	baja	baja	baja	baja
	80	alta	baja	baja	baja
*Los resultados que se muestran dentro del marco grueso son los de este ejemplo.					

5

Tal como se muestra en la Tabla 4, cuando se impregnó poliestirenosulfonato de sodio (PS-1) solo, el juicio no fue claro en las concentraciones bajas (claro en la concentración alta), mientras que al usar poliestirenosulfonato de sodio y cloruro de sodio, se obtuvo un juicio claro incluso en los casos en que la concentración de poliestirenosulfonato de sodio fue baja. De forma adicional, en el caso de que se usó poliestirenosulfonato de sodio solo, el fondo era alto a la concentración alta (Tabla 5), por lo que la facilidad de observación visual disminuyó, mientras que en el caso en el que también se utilizó cloruro de sodio, el fondo era bajo incluso en el caso de que la concentración de poliestirenosulfonato de sodio fuera alta. A partir de estas, se puede ver que es ventajoso usar tanto PS-1 como NaCl en comparación con los casos en los que se usa uno de estos solo.

10

15 Descripción de los símbolos

- 1 soporte (que contiene regiones de detección)
- 2 región de sustancia marcada
- 3 región de detección
- 4 almohadilla de muestra
- 5 banda de absorción
- 6 lámina de refuerzo

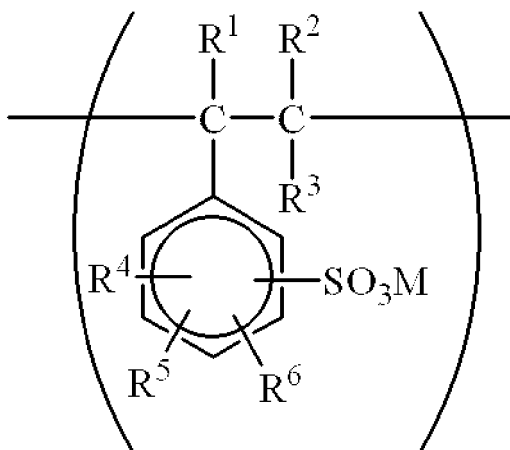
REIVINDICACIONES

1. Una tira de ensayo inmunocromatográfica que comprende, en el orden de aguas arriba, una almohadilla de muestra, una región de sustancia marcada, una región de detección y una banda de absorción, en donde

(a) uno o más polímeros en los que se polimerizan uno o más monómeros cíclicos hidrofóbicos que tienen uno o más grupos funcionales iónicos se impregnan en una o más regiones aguas arriba de dicha región de sustancia marcada;

(b) se impregnan una sal o sales inorgánicas junto con dicho uno o más polímeros; y

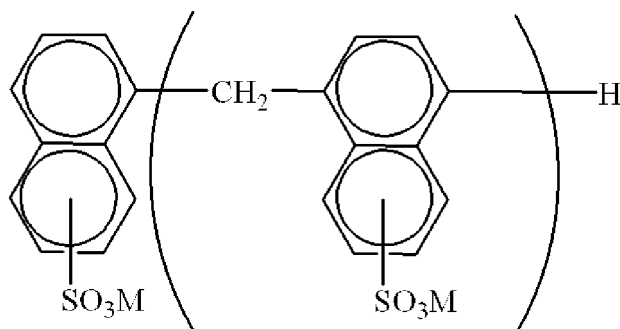
(c) (i) dichos uno o más polímeros comprenden una unidad recurrente representada por la siguiente Fórmula [II]:



[II]

en la que M representa un átomo o un grupo que se convierte en un catión monovalente en solución acuosa; R¹ a R³ representan independientemente hidrógeno o alquilo; y R⁴ a R⁶ representan independientemente hidrógeno, alcoxi C₁-C₄ o alquilo C₁-C₄; o

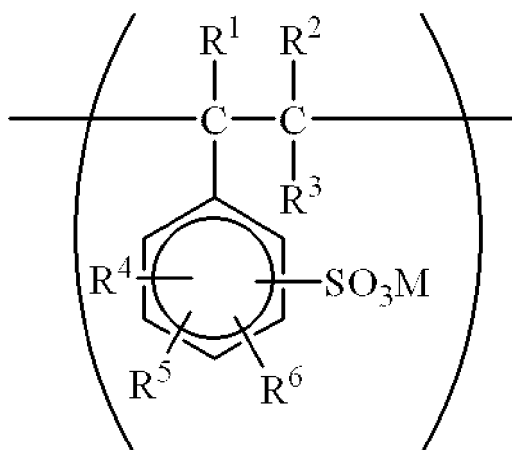
(ii) dichos uno o más polímeros comprenden una unidad recurrente representada por la siguiente Fórmula [V]:



[V]

en la que M representa un átomo o un grupo que se convierte en un catión monovalente en solución acuosa, preferentemente un metal alcalino, tal como sodio o potasio.

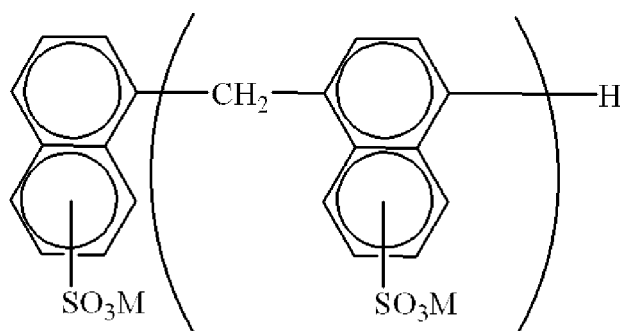
2. La tira de ensayo inmunocromatográfica según la reivindicación 1, en donde dichos uno o más polímeros comprenden una unidad recurrente representada por la siguiente Fórmula [II]:



[II]

en donde M representa un átomo o un grupo que se convierte en un catión monovalente en solución acuosa; R¹ a R³ representan independientemente hidrógeno o alquilo; y R⁴ a R⁶ representan independientemente hidrógeno, alcoxi C₁-C₄ o alquilo C₁-C₄.

3. La tira de ensayo inmunocromatográfica según la reivindicación 1, en donde dichos uno o más polímeros comprenden una unidad recurrente representada por la siguiente Fórmula [V]:



[V]

en la que M representa un átomo o un grupo que se convierte en un catión monovalente en solución acuosa, preferentemente un metal alcalino, tal como sodio o potasio.

4. La tira de ensayo inmunocromatográfica según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicha unidad recurrente es una sal de ácido anetol sulfónico o una sal de ácido estireno sulfónico.

5. Un método de inmunocromatografía que comprende el uso de dicha tira de ensayo inmunocromatográfica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

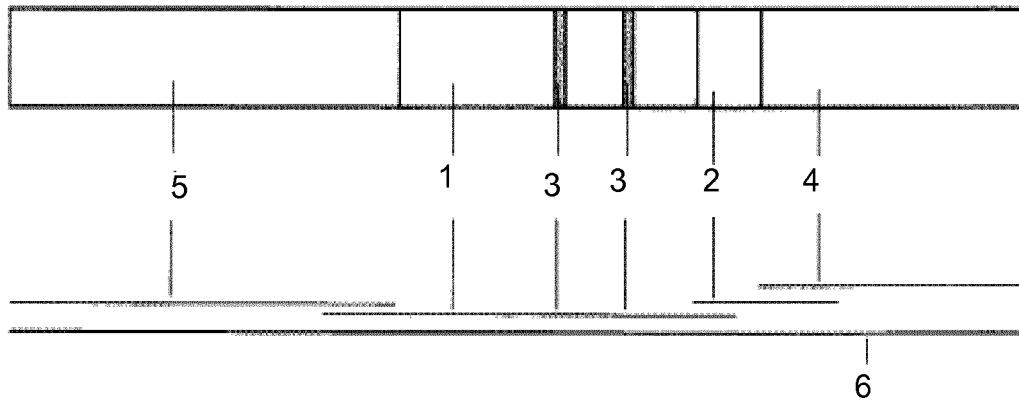


Fig.1