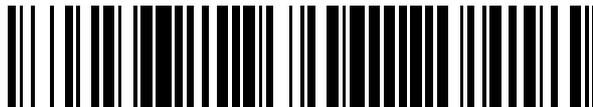


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 437**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/37 (2006.01)
G01N 33/558 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07732335 .0**
96 Fecha de presentación: **05.04.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2004845**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.12.2008**

54 Título: **UN PRODUCTO DE DETECCIÓN DE PROTEASA.**

30 Prioridad:
07.04.2006 GB 0607070

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.12.2011

73 Titular/es:
**MOLOGIC LTD
COLWORTH SCIENCE PARK
SHARNBROOK, BEDS MK 44 1LQ, GB**

72 Inventor/es:
**DAVIS, Mark James;
DAVIS, Paul James y
BURNAPP, Mark**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 370 437 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

Un producto de detección de proteasa

5 La presente invención se refiere a un producto de detección de proteasa que es adecuado para detectar una enzima proteasa en una muestra.

10 Las proteasas son enzimas que digieren proteínas, en particular hidrolizando y escindiendo enlaces peptídicos. De este modo una proteína que se degrada por una proteasa se escinde en dos o más péptidos más pequeños. La escisión de un péptido se produce cuando las proteasas hidrolizan un enlace peptídico que está adyacente a una serie específica de restos aminoácidos, aunque otras proteasas son menos específicas y requieren solamente uno o dos aminoácidos para dirigir la actividad de escisión peptídica.

15 Un área de desarrollo completamente separada ha sido la de inmunoensayos de flujo lateral. Estos inmunoensayos permiten la detección de analitos en muestras. Un ejemplo habitual de un inmunoensayo tal es un kit de ensayo de embarazo, que comprende una tira de nitrocelulosa en la que se localizan, de un extremo al otro: un área receptora de muestra absorbente; una banda de anticuerpo marcado; una banda de anticuerpo de captura y una banda de control.

20 La banda de anticuerpo marcado comprende una pluralidad de anticuerpos monoclonales, específicos para hCG (gonadotropina coriónica humana) y conjugados con partículas de oro. Los anticuerpos marcados son móviles en, y fluyen a través de, la tira de nitrocelulosa en presencia de un líquido. La banda de anticuerpo de captura comprende una pluralidad de anticuerpos monoclonales inmovilizados, cada uno específico para hCG (aunque un epítipo diferente de la misma que los anticuerpos marcados). La banda de control comprende una pluralidad de anticuerpos inmovilizados específicos para inmunoglobulina G (IgG) de una especie particular.

25 Para usar el kit para ensayar con respecto a embarazo a un individuo, se deposita una muestra (típicamente orina) del individuo en la zona receptora de la muestra. La muestra fluye de forma natural (siguiendo la fuerza capilar) a lo largo de la extensión de la tira hacia en primer lugar la banda de anticuerpo marcado, después la banda de anticuerpo de captura y finalmente la banda de control. Debe apreciarse que la tira proporciona de este modo una ruta de flujo líquido para la muestra.

30 A medida que los contenidos de la muestra pasan por la banda de anticuerpos marcados, el anticuerpo marcado se moviliza dentro de la tira y también se transporta en la dirección de la banda de anticuerpo de captura. Si hCG está presente en la muestra entonces el anticuerpo marcado se une a la hCG.

35 Cuando el anticuerpo marcado alcanza la banda de anticuerpo de captura, puede suceder una de dos cosas. Si está presente hCG en la muestra entonces la hCG se une a los anticuerpos de captura. La mayoría de la hCG ya se habrá unido a los anticuerpos marcados y por lo tanto se forma un complejo en el anticuerpo de captura inmovilizado, formando la hCG un enlace o puente entre el anticuerpo de captura y el anticuerpo marcado. Esto se denomina habitualmente un "sándwich" de anticuerpo. Como alternativa, si no hay hCG en la muestra entonces el anticuerpo marcado pasa a través de la banda de anticuerpo de captura sin interactuar con los anticuerpos de captura. Debe apreciarse que los anticuerpos de captura se inmovilizan y por lo tanto en ninguno de los casos fluyen a lo largo de la tira.

40 Posteriormente, la muestra alcanza la banda de control. Debido a que hay un exceso de anticuerpo marcado en el kit, incluso si hCG está presente en la muestra, hay suficiente anticuerpo marcado presente en el kit para asegurar que algo de material pasa más allá de la banda de anticuerpo de captura. De este modo, si hCG está presente o no en la muestra, algo de anticuerpo marcado alcanza la banda de control. En la banda de control, el anticuerpo anti-IgG inmovilizado se une a, y por lo tanto inmoviliza, el anticuerpo marcado.

45 Debe entenderse que cuando el anticuerpo se inmoviliza y concentra, la presencia de las partículas de oro forma una línea visible. Por lo tanto, si hCG está presente en la muestra (que será el caso si el individuo está embarazado) entonces se forma una línea visible en la banda de anticuerpo de captura. Independientemente de si hCG está presente o no en la muestra, se formará una línea visible en la banda de control. La línea en la banda de control es útil porque es indicativa de que el ensayo ha alcanzado su conclusión (que puede no suceder si, por ejemplo, hay insuficiente líquido en la muestra) y confirma que el dispositivo ha funcionado correctamente. También permite una comparación de la banda de anticuerpo de la banda de anticuerpo de captura con la banda de control para proporcionar certeza adicional al resultado.

50 La presente invención proporciona un producto mejorado para detectar la presencia de enzimas proteasa.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona un producto de detección de proteasa para detectar una enzima proteasa en una muestra que comprende:

65 un medio que proporciona una ruta de flujo líquido;
un componente escindible preinmovilizado en la ruta de flujo líquido en una primera localización,

- 5 comprendiendo el componente escindible un elemento base conectado a un elemento liberable mediante un péptido enlazador sensible a proteasa, comprendiendo el elemento liberable una estructura de unión a marcador e inmovilizándose el elemento base dentro de la estructura del medio mediante una unión entre el elemento base y una estructura en la ruta de flujo líquido; un marcador capaz de unirse a la estructura de unión a marcador;
- un componente de captura localizado corriente abajo de la primera localización en la ruta de flujo líquido, siendo capaz el componente de captura de unirse al elemento liberable.
- 10 El componente escindible puede estar unido al marcador (por ejemplo de forma covalente) en cuyo caso el componente escindible puede considerarse un componente marcado. Como alternativa, el componente escindible puede ser un componente separado del marcador, por ejemplo, el marcador puede comprender un anticuerpo para la estructura de unión al marcador en el elemento liberable del componente escindible.
- 15 El componente escindible se preinmoviliza en la ruta de flujo líquido, en cuyo caso la "primera localización" es la posición en la ruta de flujo líquido en la que se localiza el componente escindible.
- De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un producto de detección de proteasa para detectar una enzima proteasa en una muestra que comprende:
- 20 un medio que proporciona una ruta de flujo líquido;
- un componente marcado preinmovilizado en la ruta de flujo líquido, comprendiendo el componente escindible un elemento base conectado a la liberación de un elemento mediante un enlace sensible a proteasa de péptido, comprendiendo el elemento liberable un marcador e inmovilizándose el elemento base dentro de la estructura del medio mediante una unión entre el elemento base y una estructura en la ruta de flujo líquido;
- 25 un componente de captura localizado corriente abajo del componente marcador en la ruta de flujo líquido, siendo capaz el componente de captura de unirse al elemento liberable.
- 30 Preferiblemente, el medio que proporciona la ruta de flujo líquido es una tira absorbente, por ejemplo, una compuesta de nitrocelulosa.
- De manera práctica, el medio de inmovilización comprende una unión entre elemento base y una estructura en la ruta de flujo líquido. Por ejemplo el elemento base puede comprender biotina y la estructura en la ruta de flujo líquido es estreptavidina.
- 35 De manera práctica, el producto de detección de proteasa comprende adicionalmente un inhibidor de proteasa localizado corriente arriba del componente de captura o componentes de captura en la ruta de flujo líquido.
- 40 Preferiblemente, el producto de detección de proteasa comprende adicionalmente una barrera degradable o rompible en la ruta de flujo líquido. La barrera puede ser de entre 10 y 100 μm de grosor. Por ejemplo, en algunas realizaciones la barrera es una barrera soluble tal como colágeno, pectina o PVA.
- 45 De manera práctica, la barrera degradable o rompible comprende un borde, que se extiende hacia fuera de la ruta de flujo líquido, para evitar que el material pase alrededor de la barrera cuando pasa a lo largo de la ruta de flujo líquido. El borde puede extenderse hacia fuera al menos 0,5 mm. Generalmente el borde se extiende hacia fuera menos de 5 mm, preferentemente menos de 2 mm. Se prefiere más un borde de aproximadamente 1 mm.
- 50 Provechosamente, el producto de detección de proteasa comprende adicionalmente una zona receptora de muestras para la mezcla del componente escindible y la muestra, en la que la primera localización está dentro de la zona receptora de muestras y en la que la barrera degradable o rompible se localiza corriente abajo de la zona receptora de muestras y corriente arriba del componente o componentes de captura.
- Preferiblemente, el o cada componente de captura comprende la mitad de un par de unión.
- 55 De manera práctica, el o cada componente de captura comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 60 Como alternativa, el o cada componente de captura comprende celulosa, comprendiendo adicionalmente el elemento liberable un resto de unión capaz de unirse a la celulosa.
- Preferiblemente, el resto de unión es galactomanano o xiloglucano.
- Provechosamente, el marcador es una partícula de oro o un grupo fluoróforo.
- 65 Como alternativa, el o cada componente de captura comprende la mitad de un par de unión biotina-estreptavidina. Preferiblemente, el producto de detección de proteasa es un inmunoensayo de flujo lateral.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para detectar una enzima proteasa usando un producto de detección de proteasa de acuerdo con la invención que comprende las etapas de: proporcionar la muestra en el extremo corriente arriba de la ruta de flujo líquido y permitir que la muestra pase a lo largo de la ruta de flujo líquido; y determinar la presencia del marcador en el componente de captura y/o en la primera localización.

De manera práctica, el método comprende adicionalmente la etapa de añadir de forma separada el marcador al extremo corriente arriba de la ruta de flujo líquido y permitir que pase a lo largo de la ruta de flujo líquido.

Preferiblemente, el método comprende adicionalmente la etapa de aplicar un tampón de lavado al extremo corriente arriba de la ruta de flujo líquido después de la etapa de aplicar la muestra a la ruta de flujo líquido. Por ejemplo, pueden añadirse entre 50 y 500 µl de tampón de lavado; prefiriéndose más aproximadamente 150 µl.

En esta memoria descriptiva, cuando se hace referencia a un componente que está "sobre" una ruta de flujo líquido, puede igualmente estar "en" la ruta de flujo líquido y viceversa.

Para que la presente invención pueda entenderse más completamente y que puedan apreciarse de este modo características adicionales de la misma, se describirán ahora realizaciones de la invención, como ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

La Figura 1 es una vista en planta de un producto de detección de proteasa de acuerdo con una realización de la presente invención;

La Figura 2 es una vista esquemática de un componente del producto de detección de proteasa de la Figura 1;

La Figura 3 es una vista esquemática de otro componente del producto de detección de proteasa mostrado en la Figura 1 durante su uso;

La Figura 4 es una vista en perspectiva de un producto de detección de proteasa de acuerdo con una realización adicional de la presente invención;

La Figura 5 es una vista en planta de un producto de detección de proteasa de acuerdo con otra realización de la presente invención; y

La Figura 6 es una vista en sección transversal longitudinal esquemática de un producto de detección de proteasa ensayado en el Ejemplo 3.

En referencia a la Figura 1, un producto de detección de proteasa 1 comprende una tira de nitrocelulosa 2 que tiene los extremos primero y segundo 3, 4. Unida al primer extremo 3 hay una zona receptora de muestras 5 que comprende un material absorbente rectangular elongado de anchura ligeramente mayor que la tira de nitrocelulosa 2.

Más cerca del segundo extremo 4 se proporciona una banda de marcaje 6 que se dispone transversal al eje largo de la tira 2. La banda de marcaje 6 comprende una pluralidad de componentes marcados 7 que se muestran en más detalle en la Figura 2. El componente marcado 7 comprende un astil 8 que se moviliza dentro de la estructura de la tira 2 para mejorar el acceso de la enzima al componente marcado 7. Unido al astil 8 se proporciona un péptido enlazador sensible a proteasa 9. Unido al extremo libre del péptido enlazador sensible a proteasa 9 se proporciona un marcador 10, que en este caso es un fluoróforo pero en otras realizaciones es, por ejemplo, una partícula de oro o un resto cromogénico.

Siguiendo a lo largo de la tira 2, hacia el segundo extremo 4, se proporciona una banda inhibidora de proteasa 11, que se localiza transversal al eje largo de la tira 2. La banda inhibidora de proteasa 11 comprende un inhibidor de proteasa secado en la tira 2. Debe entenderse que la banda inhibidora de proteasa 11 no es en absoluto esencial para la invención y se omite en algunas otras realizaciones.

Siguiendo a lo largo de la tira 2 hacia el segundo extremo 4 se proporciona una banda de captura 12, que también se localiza transversal al eje largo de la tira 2. La banda de captura 12 comprende una pluralidad de componentes de captura 13, uno de los cuales se muestra esquemáticamente en la Figura 3. En esta realización, la molécula de captura 13 es un anticuerpo monoclonal, inmovilizado en la tira 2 pero este no es esencial para la invención. Lo que es importante es que cada componente de captura 13 es capaz de unirse al extremo libre del enlazador peptídico 9. En la Figura 3 el componente de captura 13 se ilustra uniéndose al enlazador peptídico 9 pero debe entenderse que esto ilustra el producto de detección de proteasa en uso. Antes de que se use el producto de detección de proteasa 1, no se unen componentes al componente de captura 13.

Para detectar un enzima proteasa activa en una muestra líquida usando el producto de detección de proteasa 1, la

muestra se deposita en la zona receptora de muestras 5 y se absorbe posteriormente en la tira de nitrocelulosa 2, adyacente al primer extremo 3. Un tampón de detección que comprende un disolvente adecuado se deposita después en la zona receptora de muestras para asegurar que hay suficiente líquido para transportar la muestra a lo largo de la tira 2. La muestra se absorbe después hacia el segundo extremo 4 de la tira 2, en la dirección de la flecha 14 a lo largo de lo que se denomina la ruta de flujo líquido.

Cuando la muestra alcanza la banda de marcaje 6, cualquier enzima proteasa en la muestra escinde el péptido enlazador sensible a proteasa 9 y libera de este modo el extremo libre del péptido enlazador junto con el marcador 10. Si, por otro lado, no hay proteasa activa en la muestra entonces el péptido enlazador 9 permanece intacto y se inmoviliza de este modo en la tira 2 mediante el astil 8.

La muestra continúa después a lo largo de la ruta de flujo líquido hasta que alcanza la banda inhibidora de proteasa 11, punto en el que cualquier enzima proteasa activa en la muestra se desactiva.

La muestra continúa a lo largo de la ruta de flujo líquido hasta que alcanza la banda de captura 12 y la pluralidad de componentes de captura 13. Puesto que cualquier enzima proteasa activa en la muestra se ha desactivado, la muestra no degrada el componente de captura 13 en sí mismo.

Si había una proteasa activa en la muestra original y ha escindido por lo tanto el péptido enlazador sensible a proteasa 9 entonces el extremo libre del péptido enlazador 9 se une al componente de captura 13 y permanece inmovilizado sobre la tira 2. Si, por otro lado, no había proteasa activa en la muestra original o cualquier proteasa en la muestra no fue capaz de escindir el péptido enlazador específico 9 entonces el componente de captura 13 no tiene nada a lo que unirse.

Posteriormente, la banda de captura 12 se visualiza. Si el marcador es un fluoróforo, como en la presente realización, entonces esto se lleva a cabo con luz ultravioleta, pero si el marcador es visible con luz natural (por ejemplo si el marcador es una partícula de oro) entonces la luz ultravioleta es innecesaria. Si el enlazador peptídico 9 se ha escindido y está unido por lo tanto al componente de captura 13 entonces la acumulación del marcador 10 en la banda de captura 12 es visible como una línea en la tira 2. Si, por otro lado, la muestra no contenía una proteasa a la que era sensible el enlazador peptídico 9 entonces no hay acumulación del marcador 10 en la banda de captura 12. Por lo tanto la presencia de una enzima proteasa activa en la muestra puede evaluarse observando la presencia o ausencia de una línea en la banda de captura 12, una vez que el ensayo se ha completado.

Debe apreciarse que si no hay proteasa presente en la muestra entonces el marcador 10 permanece en la banda de marcaje 6. Por lo tanto en algunas realizaciones alternativas, en lugar de determinar la presencia de una línea del marcador en la banda de captura 12, se mide la presencia de una línea en la banda de marcaje 6. Si el marcador está presente en la banda de marcaje 6 entonces es indicativo de la ausencia de proteasa en la muestra pero si el marcador no está presente en la banda de marcaje 6 o está presente a una intensidad reducida entonces es indicativo de la presencia de una proteasa en la muestra.

En realizaciones adicionales de la presente invención, la cantidad del marcador en la banda de marcaje 6 y la banda de captura 12 (en otras palabras la intensidad de la línea de las bandas respectivas 6, 12) se determinan ambas para evaluar la relación del marcador en las dos bandas. Determinando la relación del marcador en las dos bandas, es posible cuantificar la cantidad de, o actividad de, la enzima proteasa en la muestra. Más específicamente, cuanto mayor sea la cantidad de marcador en la banda de captura 12 en comparación con la banda de marcaje 6, más enzima proteasa, o más activa será la enzima proteasa en la muestra y viceversa.

En la realización anteriormente descrita de la invención, el componente de captura es un anticuerpo. Sin embargo, en realizaciones adicionales de la presente invención, los componentes de captura son componentes distintos de anticuerpos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el péptido sensible a proteasa contiene un resto de carbohidrato (que presenta un CIS diol) y el componente de captura es ácido fenilborónico, que es capaz de unirse al carbohidrato. En una realización particularmente preferida, el componente de captura 13 es celulosa y el péptido enlazador sensible a proteasa 9 se conjuga con galactomanano o xiloglucano, cualquiera de los cuales se unirá a celulosa. La ventaja de tales realizaciones es que la banda inhibidora de proteasa 11 no se requiere debido a que celulosa, galactomanano y xiloglucano no se ven afectados por enzimas proteasas. Otros ejemplos de pares de unión que pueden usarse son lectina (por ejemplo lectina de saúco) con un carbohidrato (un azúcar enlazado O al péptido); y estreptavidina con biotina.

En referencia ahora a la Figura 4, se muestra una segunda realización de la presente invención. Un producto de detección de proteasa 15 comprende una tira de nitrocelulosa 16 que tiene los extremos primero y segundo 17, 18. En el primer extremo de la tira de nitrocelulosa 16 se localiza una zona receptora de muestras 19 que comprende una lámina rectangular de un material absorbente que se sitúa sobre la tira 16. Impregnada en la zona receptora de muestras 19 hay un péptido sensible a proteasa conjugado con un marcador tal como un grupo fluoróforo. El péptido sensible a proteasa tiene una secuencia de escisión en la que la proteasa puede escindir el péptido. Colocada entre la tira de nitrocelulosa 16 y la zona receptora de muestras 19 hay una barrera soluble 20 compuesta de, por ejemplo, peptina y alcohol polivinílico. La barrera soluble 20 es temporalmente impermeable al líquido y se disuelve en

presencia de agua y se hace de este modo permeable después de un periodo de tiempo predeterminado.

5 Siguiendo a lo largo de la tira de nitrocelulosa 16, hacia el segundo extremo 18 se proporciona una primera banda de captura 21 que se localiza transversal al eje largo de la tira 16. La primera banda de captura 21 comprende una pluralidad de anticuerpos monoclonales, cada uno inmovilizado en la superficie de la tira 16. Los anticuerpos en la primera banda de captura 21 son específicos para una secuencia de unión del péptido localizada de modo que la secuencia de escisión esté entre la secuencia de unión y el marcador. En algunas realizaciones alternativas, los anticuerpos de la primera banda de captura 21 son específicos para la secuencia de escisión en sí misma o son específicos para un epítipo conformacional que se rompe a través de la acción de la enzima proteasa.

10 Siguiendo a lo largo de la tira 16 hacia el segundo extremo 18 de la misma se proporciona una segunda banda de captura 22, que también se localiza transversal al eje largo de la tira 16. La segunda banda de captura comprende una pluralidad de anticuerpos monoclonales, cada uno inmovilizado en la superficie de la tira 16. Los anticuerpos en la segunda banda de captura 22 son específicos para una secuencia del péptido entre la secuencia de escisión y el marcador.

15 Para usar el producto de detección de proteasa 15 para detectar la presencia de una enzima proteasa activa en una muestra acuosa, la muestra se deposita en la zona receptora de muestras 19. También se deposita un tampón de detección, como se ha descrito en relación con la realización anterior, en la zona receptora de muestras 19. La muestra empapa la zona receptora de muestras 19 pero es inicialmente incapaz de absorberse más debido a la presencia de la barrera soluble 20. Después de un periodo de tiempo, el tampón en la muestra disuelve la barrera soluble 20. Durante ese periodo de tiempo, sin embargo, la muestra se mezcla exhaustivamente con el péptido sensible a proteasa en la misma y cualquier proteasa presente en la muestra escindirá el péptido en la secuencia de escisión.

20 Una vez que la barrera soluble 20 se hace permeable, la muestra, mezclada con el péptido sensible a proteasa, se absorbe a lo largo de la tira de nitrocelulosa 16 en la dirección de la flecha 23 a lo largo de una ruta de flujo líquido.

25 La mezcla de muestra y peptidasa pasa después a través de la primera banda de captura 21. Si había alguna enzima proteasa activa en la muestra capaz de escindir el péptido entonces el péptido se habrá escindido y el anticuerpo se unirá a un fragmento peptídico que no porta el marcador. En las realizaciones alternativas, ningún péptido será capaz de unirse al anticuerpo en la primera banda de captura debido a que el anticuerpo es específico para la secuencia a través del punto de escisión o es específico para un epítipo conformacional que se rompe a través de la acción de la actividad de la enzima proteasa. Si, por otro lado, no había proteasa activa en la muestra capaz de escindir el péptido entonces se unirá péptido intacto a los anticuerpos en la primera banda de captura 21.

30 La mezcla de péptido y muestra continúa después a lo largo de la tira 16 en la dirección de la flecha 23 en la que alcanza la segunda banda de captura 22. Tanto si estaba presente como si no la proteasa en la muestra, el péptido intacto o escindido se unirá a los anticuerpos en la segunda banda de captura 22. Debe apreciarse que si la proteasa está en la muestra entonces poco o nada de marcador se unirá a la primera banda de captura 21 de modo que hay más marcador disponible para unirse a la segunda banda de captura 22.

35 La tira 16 se visualiza después para localizar el marcador en ella. Si el marcador es un grupo fluoróforo como en esta realización, entonces la tira 16 se visualiza con luz ultravioleta. Cuando el marcador se ha acumulado, es visible como una línea en la tira 16. Si el marcador se ha acumulado en la primera banda de captura 21 entonces esto es indicativo de la ausencia de una enzima proteasa activa en la muestra.

40 En una realización alternativa, se determina la presencia del marcador en la segunda banda de captura 22, siendo indicativa la presencia en la segunda banda de captura 22 de la presencia de una enzima proteasa activa en la muestra.

45 En algunas realizaciones adicionales, la presencia de marcador se determina en tanto la primera como la segunda bandas de captura 21, 22 y se evalúa la relación de la intensidad de las líneas de marcador en las dos bandas 21, 22. Más marcador en la segunda banda de captura 22 en comparación con la primera banda de captura 21 es indicativo de más enzima proteasa, o una enzima más activa, en la muestra y viceversa.

50 También debe entenderse que la segunda banda de captura 22 actúa como una "banda de control" debido a que la acumulación de marcador en la segunda banda de captura 22 indica que la muestra ha penetrado la barrera soluble 20 y ha alcanzado el final del ensayo.

55 En algunas realizaciones alternativas, la localización de la primera y segunda bandas de captura, 21, 22 se invierte, es decir la segunda banda de captura 22 está corriente arriba de la primera banda de captura.

60 Debe apreciarse que en la realización mostrada en la Figura 5, la ventaja de proporcionar la barrera soluble 20 es que puede producirse mezcla exhaustiva del péptido sensible a proteasa y la muestra antes de que la mezcla proceda a lo largo de la ruta de flujo líquido. Si no se proporcionara la barrera soluble 20 entonces la tira de

nitrocelulosa 16 tendría que ser mucho más larga para proporcionar suficiente tiempo para que se produzca la mezcla y que la proteasa escinda el péptido antes de que la mezcla alcance la primera banda de captura 21.

En referencia ahora a la Figura 5, se representa una variante de la realización mostrada de la Figura 1 dándose a componentes similares los mismos números de referencia. En esta realización, un producto de detección de proteasa 24 difiere del producto mostrado en la Figura 1 en que la banda de marcaje 6 y la banda de captura 12 se reemplazan con una banda de captura 25 y una banda de captura adicional 26, respectivamente. Además, la banda inhibidora de proteasa 11 se omite y se proporciona una barrera soluble 27 en la zona receptora de muestras 5, que separa la parte principal de la zona receptora de muestras 5 del primer extremo 3 de la tira de nitrocelulosa 2.

Se seca en la parte principal de la zona receptora de muestras 5 un péptido sensible a proteasa conjugado con un marcador tal como un grupo fluoróforo. El péptido sensible a proteasa tiene una secuencia de escisión en la que una proteasa puede escindir el péptido.

La banda de captura 25 comprende una pluralidad de anticuerpos monoclonales, cada uno inmovilizado en la superficie de la tira 2. Los anticuerpos en la banda de captura 25 son específicos para una secuencia en el péptido entre la secuencia de escisión y el marcador.

La banda de captura adicional 26 comprende una pluralidad de anticuerpos monoclonales, cada uno inmovilizado en la superficie de la tira 2. Los anticuerpos en la banda de captura adicional 26 son específicos para una secuencia de unión del péptido localizado de modo que la secuencia de escisión esté entre la secuencia de unión y el marcador. En algunas realizaciones adicionales, los anticuerpos de la banda de captura adicional 26 son específicos para la secuencia de escisión en sí misma o son específicos para un epítipo conformacional que se rompe a través de la acción de la enzima proteasa.

El producto de detección 24 se usa como en las realizaciones anteriores. De este modo se deposita una muestra en la zona receptora de muestras 5 y se añade un tampón de detección. La muestra se mezcla después con el péptido sensible a proteasa en la zona receptora de muestras 25 mientras que la barrera soluble 27 se disuelve por el tampón. Si hay una proteasa adecuada en la muestra entonces el péptido sensible a proteasa se escinde.

Después de un periodo de tiempo, la barrera soluble 27 se degrada y la mezcla de muestra, tampón y péptido sensible a proteasa pasa a lo largo de la tira 2 del primer extremo 3 al segundo extremo 4. A medida que la mezcla pasa la banda de captura 25, los anticuerpos en la banda de captura 25 se unen a los péptidos sensibles a proteasa, independientemente de si se han escindido o no por una proteasa. Sin embargo, debido a que se proporciona un exceso del péptido sensible a proteasa en la zona receptora de muestras 5, algunos de los péptidos sensibles a proteasa pasan más allá de la banda de captura 25 y alcanzan la banda de captura adicional 26.

En la banda de captura adicional 26, los anticuerpos se unen a e inmovilizan la secuencia de unión del péptido. Si el péptido sensible a proteasa se ha escindido entonces el marcador ya no está unido a la secuencia de unión y por lo tanto el marcador no se inmoviliza en la banda de captura adicional 26. En las realizaciones alternativas, el péptido no se une a los anticuerpos de la banda de captura adicional 26, en absoluto, si ha habido escisión del péptido sensible a proteasa y por lo tanto por esta razón el marcador no se acumula en la banda de captura adicional 26. Si, por otro lado, el péptido sensible a proteasa no se ha escindido entonces el marcador se acumula en la banda de captura adicional 26.

Una vez que la muestra ha pasado la banda de captura adicional 26, la tira 2 se inspecciona para determinar el resultado del ensayo. El nivel de marcador que se acumula en la banda de captura adicional 26 se compara con el nivel de marcador acumulado en la banda de captura 25. Cuanto menor sea el nivel de marcador en la banda de captura adicional 26, mayor será la cantidad, o mayor la actividad, de la proteasa en la muestra (y viceversa) puesto que es indicativo de una mayor cantidad de escisión del péptido sensible a proteasa.

Debe apreciarse que en las otras versiones de esta realización, la posición de la banda de captura y la banda de captura adicional 26 pueden invertirse entre sí (es decir la banda de captura adicional 26 puede localizarse corriente arriba de la ruta de flujo líquido de la banda de captura 25).

En una versión particular de esta realización, el marcador comprende una partícula de oro con la que se conjuga el péptido sensible a proteasa. También se conjuga con la partícula de oro un resto de galactomanano. La banda de captura 25 comprende una pluralidad de anticuerpos capaces de unirse a una secuencia de unión en el péptido, estando la secuencia de escisión entre la partícula de oro y la secuencia de unión. La banda de captura adicional 26 comprende PBA, que se une a carbohidratos que presentan un CIS diol. En ausencia de proteasa, se unen partículas de oro y se acumulan en tanto la banda de captura 25 como la banda de captura adicional 26. En presencia de una proteasa adecuada, sin embargo, la secuencia de escisión se escinde y por lo tanto cualquier péptido unido en la primera banda de captura 25 no se une a una partícula de oro. De este modo las partículas de oro sólo se acumulan en la banda de captura adicional 26 en presencia de la proteasa. En consecuencia, la presencia o ausencia de una enzima proteasa activa en la muestra puede evaluarse comparando la acumulación de la partícula de oro en la banda de captura 25 con la acumulación de partícula de oro en la banda de captura

adicional 26.

Ejemplos

5 Ejemplo 1: La Escisión de Péptido Inmovilizado en la Tira.

Usando una tira reactiva de inmunoensayo que contiene una línea de ensayo de estreptavidina 1 y una línea de ensayo de anticuerpo anti-ratón 2 se realizó el siguiente ensayo para mostrar la escisión por proteasa de un péptido inmovilizado. Se inmovilizó un péptido escindible (Fluoresceína-Val-Arg-Gly-[PEG]₂₀-Biotina (a)) en la tira mediante unión de estreptavidina/biotina y se escindió posteriormente haciendo fluir solución que contenía tripsina (que es capaz de escindir el péptido en el enlace C terminal del resto Arg) por la tira:

15 a) Se mezclaron 4 µl de péptido 0,65 µg/ml (Fluoresceína-Val-Arg-Gly-[PEG]₂₀-Biotina) con 10 µl de Albúmina de Suero Bovino (BSA 200 mg/ml) y 20 µl de solución salina tamponada con fosfato 0,01 M pH 7,4 (PBS) y se añadió a la base de las 6 tiras mantenidas verticalmente en un soporte y se permitió que realizara cromatografía a lo largo de cada tira.

20 b) Cuando toda la mezcla preparada en (a) había empapado cada tira se añadieron 150 µl de lavado de PBS a la base de cada tira y se permitió que realizara cromatografía a lo largo de cada tira.

25 c) Cuando el lavado en (b) se había extendido a lo largo de cada tira se permitió que las tiras se secan durante 30 minutos a temperatura ambiente.

30 d) Después de secar volúmenes de 20 µl de Tripsina se añadieron patrones de 0, 50, 100, 250, 500 y 1000 µg/ml a la base de tiras individuales y se permitió que realizaran cromatografía a lo largo de cada tira.

35 e) Cuando el patrón añadido en (d) se había extendido a lo largo de cada tira, se añadieron 50 µl adicionales de lavado de PBS a la base de cada tira y se permitió que realizaran cromatografía a lo largo de cada tira.

40 f) Cuando el lavado en (e) se había extendido en cada tira se mezclaron 2 µl de conjugado de oro anti-FITC y 100 µl de PBS y se añadieron a la base de cada tira y se permitió que realizaran cromatografía a lo largo de cada tira seguido de un lavado de 80 µl de PBS por tira. El conjugado de oro anti-FITC es capaz de unirse a fluoresceína y el conjugado puede unirse e inmovilizarse por el anticuerpo anti-ratón en la línea de ensayo 2.

Los resultados de las fuerzas de las señales para las líneas de ensayo 1 y 2 se tabulan en la Tabla 1 a continuación. Debe observarse que la presencia del conjugado de oro en cada línea de ensayo no se detectó directamente. Se usó fluoresceína en el péptido escindible no por sus propiedades fluorescentes sino debido a que es una molécula pequeña antigénica y están disponibles en el mercado varios anticuerpos contra ella.

Tabla 1 –Generación de Señal para líneas de ensayo 1 y 2 usando Péptido inmovilizado en Tira

Patrón de Tripsina	Línea de Ensayo 1	Línea de Ensayo 2
0 µg/ml	++++	+
50 µg/ml	+++	++
100 µg/ml	++	+++
250 µg/ml	++	+++
500 µg/ml	+	+++
1000 µg/ml	+	+++

45 Ejemplo 2:- El uso de Marcador Fluorescente para la Visualización del Resultado.

Usando una tira reactiva de inmunoensayo que contenía una línea de ensayo de estreptavidina 1 y una línea de ensayo de anticuerpo anti-ratón 2 se realizó el siguiente ensayo con un péptido escindible (Fluoresceína-Val-Arg-Gly-[PEG]₂₀-Biotina) usando fluorescencia para la detección de la actividad de Tripsina en la muestra:

50 a) Volúmenes de 4 µl de péptido 50 µg/ml (Fluoresceína-Val-Arg-Gly-[PEG]₂₀-Biotina) se mezclaron con volúmenes de 4 µl de patrón de Tripsina (0, 10, 100 y 1000 µg/ml) y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente.

55 b) A la mezcla preparada en (a), se añadieron 82 µl de BSA 33 mg/ml en PBS, se mezcló adicionalmente y se añadió después a la base de las 4 tiras sostenidas verticalmente en un soporte y se permitió que realizaran cromatografía a lo largo de cada tira.

c) Cuando toda la mezcla preparada en (b) se había extendido en cada tira se añadió un lavado de PBS de 150 µl a la base de cada tira y se permitió que realizara cromatografía a lo largo de cada tira.

5 d) Las tiras se observaron usando una fuente de luz UV para visualizar la presencia de péptido no escindido unido a la línea de ensayo 1.

Los resultados de las fuerzas de señales para la línea de ensayo 1 se tabulan en la Tabla 2 a continuación. En este ejemplo la presencia de fluoresceína genera la señal.

10 Tabla 2 – Generación de Señal para la línea de ensayo 1 usando marcador fluorescente para la visualización.

Patrón de Tripsina	Línea de Ensayo 1
0 µg/ml	+++
10 µg/ml	+
100 µg/ml	-
1000 µg/ml	-

Ejemplo 3:- La incorporación del péptido escindible en la almohadilla de muestras de una tira reactiva.

15 Usando una tira reactiva de inmunoensayo que contenía una línea de ensayo de estreptavidina 1 y una línea de ensayo de anticuerpo anti-ratón 2 se realizó el siguiente ensayo para mostrar escisión de Tripsina de un péptido escindible (Fluoresceína-Val-Arg-Gly-[PEG]₂₀-Biotina) proporcionado seco en la almohadilla de muestras de la tira reactiva:

20 a) Se preparó la siguiente solución y después se empapó con ella un almohadilla de muestras de 60*32 mm de longitud y se secó durante 3 horas a Temperatura ambiente:

1 ml de BSA 200 mg/ml + 500 µl de Tritón X-100 1% + 2 ml de d.H₂O + 2 g de Sacarosa + 500 µl de péptido escindible 50 µg/ml.

25 b) Se fabricaron tiras como se muestra en la Figura 6 y como se describe en más detalle posteriormente. Brevemente, una almohadilla receptora de muestras 29 contiene péptido escindible seco. Separando la almohadilla receptora de muestras 29 de una almohadilla intermedia 31 hay una película de PVA soluble 30. La almohadilla intermedia 31 contiene conjugado de oro anti-FITC y está en contacto con una tira reactiva absorbente 35 que contiene las líneas de ensayo 1 y 2.

30 c) Se realizaron ensayos usando patrones de Tripsina de 0 y 1000 µg/ml aplicando patrón al extremo proximal de la almohadilla de muestras marcada "A" hasta que esta almohadilla estaba completamente saturada.

35 d) Cuando se vio que la película de PVA entre la almohadilla de muestras y el conjugado se disolvía permitiendo que el patrón pasara a la almohadilla conjugada se aplicó solución adicional según se requería para permitir que la tira continuara hasta su compleción.

40 Los resultados de las fuerzas de señales para líneas de ensayo 1 y 2 se tabulan en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3- Generación de Señal para las líneas de ensayo 1 y 2 usando péptido escindible incorporado en la almohadilla de muestra de la tira reactiva.

Patrón de Tripsina	Línea de Ensayo 1	Línea de Ensayo 2
0 µg/ml	+++	++
1000 µg/ml	-	+++

45 Haciendo referencia, ahora, a la Figura 6, la tira reactiva de inmunoensayo 28 comprende, en un primer extremo, una almohadilla receptora de muestras 29 compuesta de un material absorbente. Se seca un péptido escindible seco (Fluoresceína-Val-Arg-Gly-[PEG]₂₀-Biotina) en la almohadilla receptora de muestras 29.

50 Localizada debajo de la almohadilla receptora de muestras 29 hay una película de PVA 30, de 35 µm de grosor. La película de PVA 30 se ajusta en tamaño para abarcar el extremo interior completo de la almohadilla receptora de muestras 29 y extenderse 1 mm adicional alrededor de todas las dimensiones de la almohadilla receptora de muestras 29 (excepto en el extremo exterior de la almohadilla receptora de muestras 29). La película de PVA 30 es una barrera para el paso de fluidos más allá de la almohadilla receptora de muestras 29 pero es soluble en agua después de un periodo de tiempo determinado.

55 Se localiza bajo la película de PVA 30 una almohadilla intermedia 31. La almohadilla intermedia 31 se localiza de

5 modo que el extremo exterior de la misma 32 solapa con el extremo interior 33 de la almohadilla receptora de muestras 29 quedando entre ambos el extremo interior 34 de la película de PVA 30. Además, la extensión de 1 mm de la película de PVA 30 desde el extremo interior 33 de la almohadilla receptora de muestras 29 evita cualquier comunicación de fluidos directa entre la almohadilla receptora de muestras 29 y la almohadilla intermedia 31. Se secan una pluralidad de conjugados de oro anti-FITC en la almohadilla intermedia 31.

10 Se localiza bajo la almohadilla intermedia 31 una tira absorbente 35. El extremo interior 36 de la almohadilla intermedia 31 solapa y está en contacto con el extremo exterior 37 de la tira absorbente 35. Se localizan en la tira absorbente 35 líneas de ensayo primera y segunda (no mostradas). La primera línea de ensayo, que está más cerca de la almohadilla intermedia 31 comprende estreptavidina inmovilizada en la superficie de la tira absorbente 35. La segunda línea de ensayo, que es remota desde la almohadilla intermedia 31 comprende una pluralidad de anticuerpos anti-ratón inmovilizados en la tira absorbente 35.

15 En su uso, se añade una muestra que contiene proteasa al extremo proximal de la almohadilla receptora de muestras 29, en el punto marcado A. La muestra se mezcla con el péptido escindible localizado en la almohadilla receptora de muestras 29 y escinde el péptido. Además, la muestra disuelve la película de PVA 30 y, después de un periodo de tiempo predeterminado, el péptido escindido es capaz de fluir a la almohadilla intermedia 31 en la que se mezcla con el conjugado de oro anti-FITC. La mezcla de péptido escindido y conjugado de oro anti-FITC se absorbe
20 después en la tira absorbente 35 en la que la sección que contiene biotina de péptido escindido se une a la primera línea de ensayo y la parte que contiene fluoresceína del péptido escindido, se une al conjugado de oro anti-FITC que se moviliza en la segunda línea de ensayo.

25 Como alternativa, en ausencia de una proteasa en la muestra, el péptido permanece sin escindir en la almohadilla receptora de muestras 29; la muestra se disuelve y pasa a través de la película de PVA 30 y se mezcla con el conjugado de oro anti-FITC en la almohadilla intermedia 31. El conjugado de oro anti-FITC se une a la fluoresceína del péptido no escindido, que se inmoviliza después en la primera línea de ensayo. Una pequeña cantidad del conjugado de oro anti-FITC, en la práctica, no se une al péptido escindible y el conjugado no unido se inmoviliza en la segunda línea de ensayo.

30 Debe apreciarse que, en la práctica, no todo el péptido escindible se escinde incluso cuando la muestra contiene una proteasa y por lo tanto las cantidades relativas del conjugado de oro anti-FITC inmovilizado en la primera y segunda líneas de ensayo son indicativas de la cantidad y/o eficacia de la proteasa en la escisión del péptido escindible.

35 También debe entenderse que el conjugado de oro anti-FITC se localiza en la almohadilla intermedia 31 en lugar de la almohadilla receptora de muestras 29 de modo que se minimiza la exposición del conjugado anti-FITC a la proteasa en una muestra, que podría de otro modo ejercer su actividad proteolítica contra el conjugado. En consecuencia, localizando el conjugado de oro anti-FITC en la almohadilla intermedia 31, cualquier proteólisis del conjugado se minimiza y por lo tanto la señal producida por el conjugado de oro en las líneas de ensayo se
40 maximiza.

REIVINDICACIONES

1. Un producto de detección de proteasa para detectar una enzima proteasa en una muestra que comprende:
 - 5 un medio que proporciona una ruta de flujo líquido;
 - un componente escindible preinmovilizado en la ruta de flujo líquido en una primera localización, comprendiendo el componente escindible un elemento base conectado a un elemento liberable mediante un péptido enlazador sensible a proteasa, comprendiendo el elemento liberable una estructura de unión a
 - 10 marcador y estando inmovilizado el elemento base dentro de la estructura del medio mediante una unión entre el elemento base y una estructura en la ruta de flujo líquido;
 - un marcador capaz de unirse a la estructura de unión a marcador; y
 - un componente de captura localizado corriente abajo de la primera localización en la ruta de flujo líquido, siendo capaz el componente de captura de unirse al elemento liberable.
- 15 2. Un producto de detección de proteasa de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende adicionalmente un inhibidor de proteasa localizado corriente arriba del componente de captura en la ruta de flujo líquido.
3. Un producto de detección de proteasa de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 que comprende adicionalmente una barrera degradable o rompible en la ruta de flujo líquido.
- 20 4. Un producto de detección de proteasa de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la barrera degradable o rompible comprende un borde, que se extiende hacia fuera de la ruta de flujo líquido, para evitar que el material pase alrededor de la barrera degradable o rompible cuando pasa a lo largo de la ruta de flujo líquido.
- 25 5. Un producto de detección de proteasa de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4 que comprende adicionalmente una zona receptora de muestras para la mezcla del componente escindible y la muestra, en el que la primera localización está dentro de la zona receptora de muestras y en el que la barrera degradable o rompible está localizada corriente abajo de la zona receptora de muestras y corriente arriba del componente de captura.
- 30 6. Un producto de detección de proteasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el componente de captura comprende la mitad de un par de unión.
7. Un producto de detección de proteasa de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el componente de captura comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 35 8. Un producto de detección de proteasa de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el componente de captura comprende celulosa, comprendiendo adicionalmente el elemento liberable un resto de unión capaz de unirse a celulosa.
- 40 9. Un producto de detección de proteasa de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el resto de unión es galactomanano o xiloglucano.
10. Un producto de detección de proteasa de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el componente de captura comprende biotina o estreptavidina.
- 45 11. Un producto de detección de proteasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el marcador es una partícula de oro o un grupo fluoróforo.
12. Un método para detectar una enzima proteasa en una muestra usando un producto de detección de proteasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende las etapas de: proporcionar la muestra en el extremo corriente arriba de la ruta de flujo líquido y permitir que la muestra pase a lo largo de la ruta de flujo líquido; y determinar la presencia del marcador en el componente de captura y/o en la primera localización.
- 50 13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12 que comprende adicionalmente la etapa de añadir de forma separada el marcador al extremo corriente arriba de la ruta de flujo líquido y permitir que pase a lo largo de la ruta de flujo líquido.
- 55 14. Un método de acuerdo con la reivindicación 12 ó 13 que comprende adicionalmente la etapa de aplicar un tampón de lavado al extremo corriente arriba de la ruta de flujo líquido después de la etapa de aplicar la muestra a la
- 60 ruta de flujo líquido.

