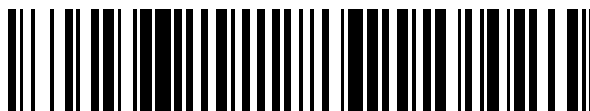


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 036**

51 Int. Cl.:

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2003 E 10160487 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2012 EP 2204654**

54 Título: **Uso de dispositivos y métodos para detectar líquido amniótico en secreciones vaginales**

30 Prioridad:

13.08.2002 US 403407 P

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

16.04.2013

73 Titular/es:

**N-DIA, INC. (100.0%)
24 School Street 6th Floor
Boston MA 02108-5103, US**

72 Inventor/es:

**PETRUNIN, DIMITRII D.;
FUKS, BORIS B.;
ZARAIISKY, EVGENY I.;
BOLTOVSKAYA, MARINA N.;
NAZIMOVA, SVETLANA V.;
STAROSVETSKAYA, NELLY A.;
KONSTANTINOV, ALEXANDR B. y
MARSHISKAIA, MARGARITA I.**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 401 036 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

Uso de dispositivos y métodos para detectar líquido amniótico en secreciones vaginales

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a un método de diagnóstico para detectar con precisión pequeñas cantidades de líquido amniótico en la vagina. En particular, la invención se refiere al uso de anticuerpos monoclonales específicamente seleccionados que se unen específicamente a la α_1 -microglobulina placentaria. Más específicamente, la presente invención se refiere a la selección de un par de anticuerpos ("par básico") que proporciona sensibilidad suficiente para la detección de la concentración de fondo mínima del PAMG-1 en la secreción vaginal de una mujer en estado de gestación. Adicionalmente, la presente invención se refiere al uso de un sistema de inmunoensayo en fase sólida que comprende anticuerpos contra PAMG-1, en los que se inmoviliza una combinación de dos o más anticuerpos anti-PAMG-1 en el soporte en fase sólida del dispositivo para establecer con precisión un umbral predefinido de nivel de sensibilidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La rotura prematura de la membrana fetal (saco amniótico) se produce aproximadamente en el 10% de las mujeres en estado de gestación y cuando no se trata rápidamente, es la causa de aproximadamente el 10% de todas las muertes perinatales. El término PROM (rotura prematura de las membranas fetales) se refiere a la rotura espontánea de las membranas a las 24 horas o más después del comienzo del parto ya sea a término o a pretérmino. La PPRM se refiere a la rotura prematura de las membranas a pretérmino. Aproximadamente alrededor del 30- 50% de dichas roturas prematuras se producen antes de la semana 37 de la gestación. En dichos casos, el diagnóstico definitivo de la rotura es extremadamente importante ya que la PROM se asocia con un aumento significativo de riesgo de una infección intrauterina y alteración del desarrollo del sistema pulmonar del feto. La introducción intrauterina de dichas infecciones aumenta tanto la morbilidad materna como la perinatal y la mortalidad en aproximadamente el diez por ciento. La diagnosis inmediata de una rotura a las 38 a 40 semanas de gestación es crucial, ya que una vez que se detecta la PROM debe inducirse el parto tan pronto como sea posible. La diagnosis de la rotura también es importante antes de las 37 semanas de gestación porque permite la prevención de infecciones intra-amnióticas y la estimulación del desarrollo pulmonar del feto.

No existe un "patrón de oro" disponible para el diagnóstico de la rotura de la membrana. La PROM es una entidad dinámica, de manera que el intervalo entre la rotura de la membrana y la implementación de la modalidad de diagnóstico, la presencia de "elevadas" pérdidas, pérdida intermitente, variaciones en la incidencia de PROM en relación con poblaciones y la consideración de material que tiene la capacidad de interferir con los resultados del ensayo son factores que cuando no se tratan dan como resultado una información incorrecta. Estas incorrecciones pueden conducir a errores de interpretación en estudios que se dirigen a descubrir la mejor herramienta para la identificación de la PROM.

El diagnóstico de la PROM se ha basado tradicionalmente en la información del paciente de la descarga de líquido desde la vagina. El examen físico es capaz de realizar diagnósticos inequívocamente; sin embargo, hay veces en las que los hallazgos del examen son inconsistentes o erróneos internamente. Esta situación exige la necesidad de ensayos de diagnóstico de confirmación (Lockwood C. J. et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1994, v. 171, N° 1, pp. 146-150). Hasta ahora se han usado diversos métodos, todos ellos insuficientes, para detectar líquido amniótico en la vagina, tales como el ensayo del hehecho (M. L. Friedman y T.W. McElin, "Diagnosis of Ruptured Fetal Membranes", *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1969, Vol. 100, pp. 544-550). Este método se basa en la detección de líquido amniótico por la observación de la denominada arborización cuando el líquido amniótico se seca en un portaobjetos. Este método, sin embargo, no es suficientemente preciso ya que se basa en las propiedades sumamente volátiles del líquido amniótico en la vagina. Esto puede producir falsos resultados en más del 30 por ciento de los casos.

También se ha propuesto detectar la rotura de la membrana fetal empleando diversos colorantes: azul Nilo, naranja de acridina, azul de bromotimol, nitracina, etc. (M. L. Friedman y T.W. McElin, anteriormente). Esta estrategia no es conveniente y tiene desventajas con respecto a la volatilidad de las propiedades químicas del líquido amniótico en la vagina y algunas posibles mezclas del mismo. Por ejemplo, una infección vaginal puede afectar a los resultados de los ensayos anteriores. Un estudio previo de los ensayos actualmente habituales de Nitrazina y Helecho indicaron que estos ensayos tenían elevadas tasas de imprecisión, que aumentaban progresivamente cuando había transcurrido más de una hora desde la rotura de la membrana y se hizo incierto después de 24 horas. El estudio concluye que en casos de PROM prolongada estos ensayos no proporcionan mejor información de diagnóstico que la obtenida por simple evaluación clínica (Gorodeski I.G., Haimovitz L., Bahari C.M., *Journal Perinat. Med.*, 1982, v. 10, N° 6, págs. 286-292). Los datos más recientes (Trovo S. et al., *Minerva Ginecol.* 1998, v. 50, N° 12, págs. 519-512) de los ensayos son:

65 Los ensayos de Nitrazina muestran una sensibilidad del 70%, una especificidad del 97% y una precisión del 90%; Los ensayos Helecho muestran una sensibilidad del 70% y una precisión del 93%.

Se ha propuesto recientemente detectar la rotura de las membranas fetales basándose en un análisis inmunoquímico de las proteínas en el líquido amniótico. Los análisis inmunoquímicos incorporados utilizan las siguientes proteínas del líquido amniótico para detectar una rotura de membrana: alfa-fetoproteína, prolactina, fibronectina y el factor del crecimiento de tipo insulina unido a proteína 1, véase B.L. Rochelson et al., "Rapid Assay – Possible Application in the Diagnosis of Premature Rupture of the Membranes" en *Obstetrics and Gynecology*, 1983, v. 62, pp. 414-418; P.R. Koninckx et al., "Prolactin Concentration in Vaginal Fluid: a New Method for Diagnosing Ruptured Membranes", *British J. Obstetr. Gynecol.*, 1981, v. 88, pp. 607-610; P. Hellemans, et al., "Preliminary Results with the Use of the ROM Check Immunoassay in the Early Detection of Rupture of the Amniotic Membranes", *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 1992, v. 43(3), pp. 173-179; Rutanen, E.M., et. al., "Measurement of Insulin-like Growth-Factor binding Protein-1 in Cervical/Vaginal Secretions: Comparison with the ROM Check Membrane Immunoassay in the Diagnosis of Ruptured Fetal Membranes", *Clin. Chim. Acta.*, 1993, v. 214, pp. 73-81. Rutanen, E.M., et al. desarrollaron posteriormente un ensayo cromatográfico usando la membrana cromatográfica colocada al revés (FI-84863; Patente de Estados Unidos N° 5.554.504).

Los métodos que se basan en la detección de alfa-fetoproteína (AFP) y prolactina (PRL) no son fiables ya que la proporción sangre/líquido amniótico de las proteínas AFP y PRL es propensa a variaciones significativas. La AFP y la PRL están presentes en el líquido amniótico a elevadas concentraciones tan solo durante el segundo trimestre de gestación. En ambas proteínas la proporción de la concentración de proteína en líquido amniótico/suero es tan solo aproximadamente de 3 a 4 a término.

Otro método basado en la detección de fibronectina fetal en las secreciones vaginales también se ha observado que no es satisfactorio. Por ejemplo, la presencia de fibronectina fetal puede tener lugar incluso en ausencia de la rotura de membrana fetal (P. Hellemans, et al., "Preliminary Results with the Use of the ROM Check Immunoassay in the Early Detection of Rupture of the Amniotic Membranes", *Eur. J. Obstetr. Gynecol. Reprod. Biol.* 1992, v. 43(3), pp. 173-179; C. Lockwood, et al., "Fetal Fibronectin in Cervical and Vaginal Secretions as a Predictor of Preterm Delivery", *New England Journal of Medicine*, 1991, v. 325, pp. 669-674), produciendo por lo tanto resultados positivos falsos.

Todos estos métodos de detección de la rotura de la membrana fetal, basados en la detección de alfafetoproteína, prolactina y fibronectina son imprecisos debido a factores variables en el control de la concentración de estas proteínas en el líquido amniótico y a la concentración relativa de estas proteínas en el líquido amniótico y por tanto en el suero en sangre.

En cuanto al actual ensayo de la IGFBP-1 (proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina de tipo 1), existen datos contradictorios con respecto a su especificidad y precisión. Se ha desarrollado un ensayo de tira rápida (ensayo PROM por OY Medix Biochemica, Finlandia, también denominado Amni-check, MAST Diagnostica, Alemania), para detectar la presencia de la IGFBP-1 en las secreciones vaginales (Rutanen EM, Karkkainen TH, Lehtovirta J., Uotila JT, Hinkula MK, Hartikainen AL. "Evaluation of a rapid strip test for insulin-like growth factor binding protein-1 in the diagnosis of ruptured fetal membranes", *Clin Chim Acta* 1996 Sep. 30; v. 253(1-2), págs. 91-101). E. Rutanen indicó que el límite de detección del ensayo se ajustó para que las concentraciones de IGFBP-1 por debajo de 400 ng/ml en la secreción cervical (por debajo del 95 percentil de los niveles de IGFBP-1 en suero en gestantes) debe permanecer negativo. Sin embargo, en casos con sangrado, el resultado del ensayo debe interpretarse con cuidado ya que la sangre directa desde el lecho placentario puede contener mayores cantidades de IGFBP-1 que la sangre de los vasos sanguíneos cervicales.

Todos los ejemplos (n = 55) en mujeres con PROM clínicamente confirmada mostraron un resultado positivo y 71 muestras de 75 tomadas de mujeres asintomáticas fueron negativas de acuerdo con el ensayo. Entre este conjunto de muestras, el ensayo tuvo una sensibilidad de 100% y una especificidad del 94,7%. Este hecho puede explicarse por la insuficiente especificidad (reactividad cruzada) del anticuerpo monoclonal usado en la primera etapa de ensayo.

Entre las 181 pacientes evaluadas por sospecha, pero después de un examen inicial de PROM erróneo, el ensayo fue positivo en 64 casos y negativo en 117 casos. Cincuenta de 64 pacientes con resultado positivo (78,1%) dieron a luz antes de la semana 37 de gestación, 42 (65,6%) en las 2 semanas después del muestreo. Cinco de 117 pacientes con un resultado de ensayo negativo tuvieron cesárea electiva por razones no asociadas a PROM. Entre las otras 112 pacientes, 102 (91,1%) dieron a luz a término y 10 (8,9%) dieron a luz antes de 37 semanas, siete de estas (6,3%) en las dos semanas después del muestreo (E. Rutanen et al. 1996). Desafortunadamente, no existen datos respecto a la sensibilidad y especificidad del ensayo PROM en mujeres con diagnóstico inequívoco de PROM.

En un estudio de W. Woltmann, se usó Amni-check para detectar la IGFBP-1 en 150 muestras de líquido amniótico y en 50 muestras de secreción vaginal de mujeres sin confirmación clínica de PROM. Un ensayo tuvo una sensibilidad del 97% y una especificidad del 100% (Woltmann W. et al., *Z. Gebursh. Neonatal*, 1995, v. 199, págs. 243-244).

V. Ragosh evaluó la precisión del diagnóstico del ensayo Amni-check en las 75 muestras de secreción vaginal. El ensayo mostró una sensibilidad del 100% y una especificidad del 83%. Los investigadores indicaron que la

proporción de positivos falsos dependía en gran medida de la actividad del parto. En mujeres con contracciones uterinas, el ensayo tuvo una especificidad del 59% (Ragosch, V. et al., *Geburtsh. U. Frauenheilk.*, 1996, Vol. 56, págs. 291-296).

5 En un estudio de E. Darj y S. Lyrenas (*Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 1998, v. 77, págs. 295-297) el ensayo de PROM tuvo una sensibilidad del 95,7% y una especificidad del 93,1% entre las pacientes con diagnóstico clínicamente confirmado (mujeres con rotura obvia de membranas o mujeres con membranas intactas). Sin embargo, la sensibilidad y la especificidad del ensayo de PROM era tan solo del 70,8% y del 82,8% respectivamente
10 que hace que sea imposible detectar una pequeña cantidad de líquido amniótico en las secreciones vaginales de pacientes con diagnóstico erróneo (por ejemplo, en el caso de una pequeña rotura).

Por tanto un nivel de fondo significativo de IGFBP-1 vaginal en mujeres con membranas intactas y un elevado umbral límite del ensayo puede perjudicar su sensibilidad y especificidad y por tanto influenciar en la precisión del
15 ensayo en pacientes con diagnóstico erróneo. Las mezclas de suero en sangre y/o exudado inflamatorio también podrían ejercer influencia en la precisión del ensayo (véanse los datos de E. Darj y S. Lyrenas, anteriormente). El autor de este ensayo no estudió la cuestión.

En el intento de evitar algunos de los inconvenientes mencionados anteriormente, se usaron dos anticuerpos
20 monoclonales contra dos sitios de unión para factores del crecimiento de tipo insulina para detectar la fracción no unida de α_1 -microglobulina placentaria (Patentes de Estados Unidos Nº 5.968.758; 5.597.700; 5.891.722; 5.877.029).

En estas patentes, se supuso infundadamente que la identidad de las dos proteínas no unidas era PAMG-1 y
25 IGFBP-1. De hecho, dicha suposición podría basarse tan solo en la comparación de la estructura primaria y de los genes de estas proteínas.

En las patentes mencionadas anteriormente no fue posible establecer el umbral de sensibilidad de dichos ensayos para conseguir el máximo grado de precisión posible (99% o superior). El problema común para dichos ensayos es el nivel de fondo y la variabilidad de la concentración de fondo de la sustancia detectada. Por ejemplo, el nivel de
30 fondo de otra proteína, IGFBP-1, en la secreción vaginal de las gestantes, varía en un amplio intervalo de 0,5 a 90 ng/ml (véanse los estudios de Rutanen). El segundo punto importante es la posibilidad de mezclas de exudados de inflamación o de suero en sangre conteniendo la sustancia detectada en la secreción vaginal. Esto puede causar resultados positivos falsos.

35 D. Petrunin fue el primero en describir la proteína PAMG-1 (Petrunin D. et al, *Akusherstvo i Ginekologia*, 1977, Nº. 1, p. 64, en Ruso; véase también PMID: 65924 (PubMed-indexed for MEDLINE: "Immunochemical identification of organ specific human placental alpha-globulin and its concentration in amniotic fluid", *Akusherstvo i Ginekologia* (Moscú) enero 1977, Vol. 1, p. 64)). Los anticuerpos se obtuvieron contra la proteína purificada y aislada y los métodos inmunoquímicos permitieron medir los contenidos de la proteína en el líquido amniótico (incluyendo el
40 líquido amniótico tomado de la vagina) a diferentes fases del gestación. También se midió la concentración de la proteína en la sangre y en diferentes órganos del feto y del adulto.

Este grupo de investigación continuó publicando nuevos resultados sobre la proteína durante años posteriores, hasta 1990 (Petrunin, D. et al, "Comparative Study of Four Placental Protein During Gestation", *Akusherstvo i Ginekologia*, 1988, Nº 1, págs. 50-52; Zaisky, E. et al, *Voprosy Med. Khimii*, 1989, Nº 5, págs.131-132; Tatarinov, Y. et al, *Uspekhi Sovr. Biologii* 1990, Vol. 109, págs. 369-373; Boltovskaya, M. et al, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 1991, Nº 7, págs. 397-400; Nasimova, S.V. et al, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 1993 Sep; Vol. 116, Nº. 9, págs 302-304 (todos estos documentos están escritos en ruso con resúmenes en inglés). D. Petrunin obtuvo el Certificado de Invención en el método de aislamiento de la PAMG-1 (Nº SU-1614184 A1, año de
50 Prioridad 1988).

En el 1988-89 se publicaron algunos trabajos detallando la secuencia parcial y completa de proteína similares, las Proteínas de Unión al Factor de Crecimiento de tipo Insulina (IGFBP), obtenidas del líquido amniótico, de la placenta y de hepatoma humano (Bell S et al, 1988; Luthman H. et al, 1989; Julkunen et al, 1988; Lee, Y. et al, 1988). El gen se localizó en el segmento 7p14-7p12 del séptimo cromosoma humano. Antes de 1991, los investigadores usaron
55 diferentes nombres para esta proteína: α_1 -PEG, PP-12, IGFBP, BP-25, etc.

En 1980-82, Bohn aisló una proteína de la placenta y la denominó PP-12. En ese trabajo, comparó la PP-12 con la proteína PAMG-1, descubierta anteriormente, y planteó las similitudes y diferencias entre ellas.
60

A diferencia de las otras publicaciones de investigación había un trabajo de Bell et al. (1988), que observó polimorfismo en el péptido N-terminal de la proteína α_1 -PEG, particularmente en las posiciones 11 y 12, y llegó a la conclusión de que eran, realmente, dos proteínas diferentes en lugar de una.

65 S. Bell de nuevo hace referencia en su propio trabajo con respecto a las dos proteínas diferentes α_1 -PEG en el líquido amniótico. Este trabajo acepta la decisión del Comité de Nomenclatura 1990 (Report on the Nomenclature of

the IGF Binding Proteins, *Journ. Clin. Endocr. and Metabol* 1990,70, N° 3, p.817), que decide que las proteínas AFBP, PP-12, α_1 -PEG, GH-Proteína, Proteínas de Unión 28, 26, 25, JB-1 son idénticas y las dio a todas un nombre general hIGFBP-1.

5 Se usó una PAMG-1 denominada libre para detectar la rotura de las membranas fetales. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, no se creó ningún ensayo con elevada precisión (> 99%). Este objetivo se consiguió después con nuestro nuevo método y dispositivo, descrito en esta Solicitud. La presente invención emplea un método de selección de un par de anticuerpos monoclonales para proporcionar sensibilidad suficiente para detectar una concentración muy baja de PAMG-1 en la secreción vaginal y también implica la selección de algunos otros anticuerpos anti-PAMG-1 que en combinación de los dos anticuerpos mencionados anteriormente, permite establecer de manera precisa un umbral de sensibilidad predefinido para el dispositivo de tira. Es decir, a su vez, hace posible minimizar la frecuencia de resultados positivos falsos del ensayo.

15 La presente invención comienza a partir del estudio pionero de D. Petrunin, quien separó y describió la alfa microglobulina placentaria y llevó a cabo una completa medición de su concentración en el líquido amniótico, en la sangre y en algunos tejidos usando métodos inmunoquímicos. Esta publicación es del dominio público que debe tener en cuenta cualquier investigador. El método de separación de PAMG-1 se ha protegido por un certificado de autor oficial (N° SU-1614184 AI, año de prioridad 1988), un equivalente de una patente en la antigua URSS.

20 DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al método para detectar una pequeña cantidad de líquido amniótico en secreciones vaginales durante la gestación.

25 La presente invención se refiere al método para detectar PAMG-1 por encima de la concentración de fondo mínima de la proteína amniótica PAMG-1 en la secreción vaginal de mujeres en estado de gestación, que indica la presencia de líquido amniótico.

30 En una realización específica, el método para la detección de la proteína PAMG-1 utiliza un par de anticuerpos monoclonales especialmente seleccionados para detectar la concentración de fondo mínima de la proteína PAMG-1 en la secreción vaginal. Este par de anticuerpos ha sido utilizado en combinación con al menos un anticuerpo monoclonal adicional anti-PAMG-1 para establecer de manera precisa un determinado umbral de sensibilidad del ensayo.

35 La invención contempla adicionalmente el uso de una combinación de anticuerpos de captura de PAMG-1 en un dispositivo de tira para permitir un ajuste más preciso del umbral de sensibilidad en el método para detectar la proteína amniótica PAMG-1 en la secreción vaginal. Esta estrategia proporciona mayor control de sensibilidad e de intervalo dinámico que el uso de un solo par de anticuerpos seleccionados.

40 El nivel del umbral de sensibilidad más apropiado del método se encuentra que está próximo a 5 ng/ml ya que el nivel superior de PAMG-1 en la secreción vaginal, que podría producirse por inflamación, no supera los 3 ng/ml, y por otro lado, el nivel de fondo regular de PAMG-1 en la secreción vaginal de mujeres sanas en estado de gestación es de aproximadamente 0,2 ng/ml. El intervalo significativo entre el nivel de fondo y la concentración del umbral de la sustancia detectada minimiza los resultados negativos falsos y positivos falsos. En una realización, la primera etapa de reconocimiento de la PAMG-1 amniótica tiene lugar en la parte de la almohadilla del dispositivo de tira, en la que se localiza el anticuerpo seleccionado y marcado especialmente. La segunda etapa de la reacción tiene lugar en la región de ensayo del dispositivo de varilla en la que se inmoviliza el segundo anticuerpo del par seleccionado y preferiblemente al menos un anticuerpo anti-PAMG-1 adicional.

50 En resumen, se describe el método y uso de un dispositivo para detectar pequeñas cantidades de líquido amniótico en la vagina de una mujer en estado de gestación. El método se basa preferiblemente en la selección del par de anticuerpos monoclonales contra α_1 -microglobulina placentaria (PAMG-1). El objetivo de la selección era, en primer lugar, medir una concentración mínima de fondo de PAMG-1 en la secreción vaginal. Teniendo esta información, para detectar líquido amniótico en secreciones vaginales, puede emplearse cualquier técnica analítica capaz de detectar PAMG-1 por encima del nivel del umbral. Basándose en esta información, se puede crear un dispositivo basándose en el uso del mismo par y anticuerpos adicionales para reducir y establecer de manera precisa el umbral de sensibilidad del dispositivo y por lo tanto minimizar la probabilidad de resultados negativos falsos y positivos falsos.

60 Son posibles diversas combinaciones de anticuerpos de captura y fragmentos de los mismos o combinaciones de cualquier otra molécula con las mismas propiedades que las propiedades especificadas en la presente memoria.

65 En una realización de la presente invención el método comprende el contacto de una muestra que contiene la proteína PAMG-1 y el anticuerpo monoclonal, el primero del par seleccionado, que detecta selectivamente PAMG-1. Adicionalmente comprende el anticuerpo que forma el complejo anticuerpo-PAMG-1 y la etapa de detección de un complejo anticuerpo-PAMG-1 por otro anticuerpo monoclonal marcado del par. Finalmente comprende la medición

cuantitativa del fondo mínimo reducido de PAMG-1 en la secreción vaginal de mujeres en estado de gestación que no tienen rotura de las membranas amnióticas. Este método a menudo se usa en ensayos de tipo ELISA.

En otra realización más de la presente invención, el dispositivo se utiliza para implementar el contacto de una muestra que contiene la proteína PAMG-1 y un anticuerpo monoclonal marcado, el primero del par seleccionado, que detecta selectivamente la PAMG-1. Adicionalmente comprende el anticuerpo que forma un complejo anticuerpo-PAMG-1, el flujo lateral de este complejo y la etapa de detección del complejo anticuerpo PAMG-1 por otro anticuerpo monoclonal que reconoce PAMG-1 por lo que era el umbral de sensibilidad del dispositivo se establece aproximadamente en el intervalo de 5-7 ng/ml usando anticuerpos adicionales con una mayor precisión que la precisión que puede conseguirse usando el par de anticuerpos monoclonales que reconocen la PAMG-1.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 es una vista en sección longitudinal esquemática de un dispositivo de la invención que puede usarse para detectar la presencia de PAMG-1 para el diagnóstico de la rotura de una membrana fetal.

La FIG. 2 es una vista plana del dispositivo de la FIG. 1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a los problemas anteriormente mencionados de detectar de manera precisa líquido amniótico en secreciones vaginales detectando concentraciones muy bajas de α_1 -microglobulina placentaria en secreciones vaginales. Esta estrategia demuestra ventajas debido a un reducido nivel de fondo (aproximadamente 0,2 ng/ml en secreciones vaginales de mujeres en estado de gestación) de la concentración de PAMG-1. El punto crucial de esta invención era la selección del anticuerpo monoclonal para detectar la proteína a concentración baja, que permite la cuantificación de estos valores y a su vez, permite usar cualquier técnica analítica para detectar el nivel de PAMG-1. La presencia de PAMG-1 a baja concentración en secreciones vaginales podría esperarse ya que la permeabilidad de la pared de los capilares para las proteínas sanguíneas depende de modificaciones post-traduccionales de las proteínas y de su interacción con otras moléculas (Marinaro J. A. et al: O-glycosylation delays the clearance of human IGF-binding protein-6 from the circulation; Eur J Endocrinol 2000, May; 142(5): 512; Schneeberger E.E.: Proteins and vesicular transport in capillary endothelium; Fed Proc mayo 1983 15; 42(8): 2419-24; Minshall RD et al: Vesicle formation and trafficking in endothelial cells and regulation of endothelial barrier function; Histochem Cell Biol 2002 Feb; 117(2): 105-12; Del Vecchio PJ et al: Endothelial monolayer permeability to macromolecules; Fed Proc 1987 Jun; 46(8): 2511-5; Siflinger-Birnboim A et al: Selectivity of the endothelial monolayer: effects on increase permeability; Microvasc Res 1998 Nov; 36(3): 216-27; Ghinea N, Milgrom EA new function for the LH/CG receptor: transcytosis of hormone across the endothelial barrier in target organs; Semin Reproduct Med 2001; 19(1): 97-101). Entre las moléculas de PAMG-1, que se sometieron a modificaciones post-traduccionales, o establecieron un enlace no covalente con otras moléculas, se encuentran aquellas cuya introducción en la secreción vaginal es mínima. La concentración de dichas moléculas en la secreción vaginal debe ser baja, salvo que exista una rotura en el saco amniótico. La heterogeneidad de las moléculas de PAMG-1 también podría ser el resultado de un corte y empalme alternativo. Bell et al presentaron datos con respecto a dos proteínas parecidas, pero diferentes, de α_1 -PEG en el líquido amniótico. Alfa₁-PEG es parecida a PAMG-1. La baja o elevada introducción de diferentes moléculas en la secreción vaginal se produce debido a la permeabilidad selectiva de las paredes de los capilares y a los procesos secretorios selectivos. Un inmunoensayo satisfactorio requiere detectar bajas concentraciones de fondo de las moléculas de PAMG-1 en la secreción vaginal.

Se seleccionó satisfactoriamente un par de anticuerpos monoclonales capaces de dicha detección. Las características exactas de las moléculas de PAMG-1 detectadas no parecen importantes para los propósitos de esta invención, con una excepción: debe ser segura su baja concentración en la secreción vaginal. Este parámetro es suficiente para establecer el umbral de sensibilidad a un nivel bajo, manteniendo un intervalo significativo entre el umbral del ensayo y el nivel del fondo de la concentración de PAMG-1 en la secreción vaginal. Esta selección del umbral óptimo permite filtrar tanto los resultados negativos falsos como los positivos falsos del ensayo.

En particular, los anticuerpos monoclonales (MAb) contra alfa-1-microglobulina placentaria se estudiaron basándose en su reacción en el sistema conjugado MAb-PAMG-1 de otro MAb de la presente invención (Ejemplo 4, Tabla 6). La titulación más elevada se observó usando específicamente el par M271-M52. Sin embargo, usando el par MAb271-MAb52 y la técnica ELISA rutinaria, los solicitantes no detectaron ninguna concentración de PAMG-1 en la secreción vaginal. Se desarrolló una técnica ELISA de alta sensibilidad para el par MAb271-MAb52 (Ejemplo 5, Tabla 7) y se empleó para medir concentraciones bajas (intervalo de picogramos) de PAMG-1 en muestras vaginales (Ejemplo 6, Tabla 8) y después tanto en secreciones del cuello uterino como en la vagina de mujeres en estado de gestación ((Ejemplo 7, Tabla 9). En el ELISA, la primera capa se formó a partir del MAb de elevada especificidad M271. El conjugado de peroxidasa de rábano picante contenía el MAb M52, diluido en el tampón que no contenía ningún agente inhibidor.

Del Ejemplo 7, Tabla 9 puede observarse que la concentración de PAMG-1 en las secreciones del cuello uterino y vagina de mujeres en estado de gestación sin complicaciones en la gestación varían de 0,05 a 0,22 ng/m. A partir de estos datos también puede observarse que

- 5 - la concentración normal de PAMG-1 (8 casos) se localiza alrededor de algún nivel estable. La estabilidad relativa de PAMG-1 tanto en la vagina como en el cuello uterino puede servir como una indicación de la estabilidad de los parámetros del método y del modo estandarizado de recogida de muestras;
- los niveles medios de la concentración normal de PAMG-1 en la secreción del cuello uterino es aproximadamente de 151 pg/ml, en la secreción vaginal es aproximadamente de 110 pg/ml;
- 10 - en el caso de patología gestacional, no relacionada con trastornos en los vasos sanguíneos (anemia, retraso en el desarrollo del feto), también se observó un nivel casi normal de PAMG-1.
- la mezcla de sangre viene acompañada de un aumento de la concentración de PAMG-1 en el cuello uterino, que se observó al nivel de 290 pg/ml, a diferencia de la concentración normal de 151 pg/ml;
- el nivel de PAMG-1 aumenta en presencia de síntomas de parto pretérmino y de gestosis, que pueden estar acostumbrado a la permeabilidad aumentada de las membranas fetales con respecto a las proteínas;
- 15 - dada una pérdida de líquido amniótico, el nivel de PAMG-1 aumenta drásticamente (por un factor de 10-50).

Como se muestra más abajo en los ejemplos, se seleccionó un par de anticuerpos monoclonales M271 y M52 para desarrollo adicional del método, dispositivo y kit de ensayo.

20 La presente invención por tanto se refiere en particular a un método para detectar pérdida de fluido amniótico en secreciones vaginales que utiliza un par de anticuerpos monoclonales seleccionados que tienen actividad de unión por PAMG-1. La presente invención también se refiere al uso de un dispositivo y métodos para detectar PAMG-1, así como la rotura de membrana fetal, basándose en la presencia de líquido amniótico en la vagina, como se indica por la presencia de PAMG-1 en la secreción vaginal.

25 Como se describirá en la presente memoria con mayor detalle, la presente invención surge en parte de un estudio con un par de anticuerpos monoclonales que permite la detección de la concentración mínima de fondo de PAMG-1 en la secreción vaginal de mujeres en estado de gestación. La concentración mínima de fondo de PAMG-1 en la secreción vaginal y su elevada concentración en el líquido amniótico permite, en primer lugar, establecer el umbral de sensibilidad de un dispositivo a un nivel bajo y por tanto detectar cantidades muy pequeñas de líquido amniótico en la secreción vaginal y en segundo lugar localizar el umbral de sensibilidad del dispositivo de una manera óptima, específicamente entre el nivel típico de la baja concentración mínima de fondo de PAMG-1 en la secreción vaginal de mujeres en estado de gestación sin rotura de membranas fetales y un elevado nivel típico de PAMG-1 en el líquido amniótico. Un anticuerpo o anticuerpos monoclonales adicionales contra PAMG-1 permite establecer de manera más precisa el umbral de sensibilidad del dispositivo a un nivel predefinido por ejemplo, para análisis semi-cuantitativos. Adicionalmente, como la presencia de líquido amniótico en la sección vaginal es un indicativo de una rotura de la membrana fetal, la detección de PAMG-1 en la secreción vaginal también puede usarse para detectar la rotura de membranas fetales. Todo esto en combinación permite minimizar falsos resultados del ensayo detectando PROM y PPRM.

40 De acuerdo con la presente invención, los anticuerpos específicos para PAMG-1 pueden incorporarse en las composiciones en cuestión, los dispositivos y métodos usados para la detección de PAMG-1 y por lo tanto la aparición de una rotura de membrana fetal basándose en la presencia de PAMG-1 en la secreción vaginal.

45 **Proteína PAMG-1**

La PAMG-1 es una proteína que está presente en el suero, líquido amniótico y secreción vaginal de mujeres en estado de gestación y en el suero de todo el mundo. La PAMG-1 esta presente en el suero de mujeres no gestantes (0-60 ng/ml) y gestantes (5-120 ng/ml) en la que la concentración medida depende del par de anticuerpos monoclonales que se ha usado para su detección (Ejemplo 1, tablas 1, 2). Se sabe que el uso de pares de anticuerpos diferentes contra la misma proteína puede producir una concentración medida diferente de esa proteína. Por tanto, en un estudio análogo de Diamandi A. et al. (véase Diamandi A. et al. "Immunoassay of the Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-3" en *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2000, June, Vol. 85, Nº 6, págs. 2327-2333), tres variantes de ELISA mostraban tres concentraciones diferentes de IGFBP-3, en el que Diamandi A. et al lo atribuyeron a la capacidad de cada par de anticuerpos para recoger una modificación post-traduccional específica de las moléculas de la proteína. La PAMG-1 se encuentra en el líquido amniótico a una concentración significativamente superior que en suero (2000-75.000 ng/ml).

60 D. Petrunin aisló, en 1977, la PAMG-1 del líquido amniótico y se denominó originariamente alfa-1 globulina específica de la placenta (D. Petrunin, et al., "Immunological Identification of Organ Specific alpha-1 Globulin of Human Placenta and Its Content in the Amniotic Fluid", en *Akusherstvo i Ginekologiya*, 1977, N 1, págs. 64-65, Moscú, Rusia (véase el Ejemplo 2)).

65 Posteriormente Bohn, et al. ("Isolierung und Charakterisierung eines Neuen Placentaspezifischen Proteins (PP12)", en *Arch. Gynecol.*, 980, Vol. 229, págs. 279-291) aislaron y purificaron una proteína similar pero no idéntica, identificada como PP12 (proteína placentaria 12), de las membranas placentarias y fetales. S. Bell, et al.

describieron la separación de la proteína PEG-1 endometrial, diferente de la PP12 en dos sustituyentes aminoacídicos (aminoácidos N11, 12) en los péptidos N-terminales de 15 aminoácidos (S. Bell, et al., *American Journal of Reproductive Immunology*, 1989, Vol. 20, págs. 87-96).

- 5 Para caracterizar adicionalmente las proteínas y identificadas del líquido amniótico, se realizó una serie de mediciones para determinar el peso molecular de PAMG-1. El método inmunotransferencia usó para determinar el peso molecular de PAMG-1, que se observó que era de 32 kDa (kilodalton, kD es una unidad de masa atómica) (Boltovskaya, M. N. et al., "Histochemical and Clinico-Diagnostic Study of the Placental Alpha-Microglobulin [PAMG-1] Using Monoclonal Antibodies", en *Bulletin of Experimental. Biology and Medicine*, 1991, N° 10, págs. 397-400).
- 10 Los solicitantes suponen posteriormente que la PAMG-1 se relaciona con la familia de proteínas de IGFBP (véase la Patente de Estados Unidos N° 5.968.758).

La PAMG-1 puede estar presente en isoformas diferentes, es decir, que han experimentado diferentes modificaciones post-traduccionales. Los anticuerpos pueden tener especificidad diferencial por una isoforma sobre otra, y por tanto, esto puede usarse en beneficio en el ensayo de la invención.

15 **Anticuerpos contra PAMG-1**

Originariamente, se usaron anticuerpos monoespecíficos contra PAMG-1 (véase, por ejemplo, Tatarinov, Y. et al, en *Uspekhi Sov. Biologii*, 1990, Vol. 109, págs. 369-373). Posteriormente, se obtuvieron anticuerpos capaces de reconocer tan sólo aquellas moléculas de PAMG-1 sin IGF-1 e IGF-2 (Patente de Estados Unidos N° 5.891.722).

En la presente memoria, el término "anticuerpo" se refiere a cualquier proteína que tiene una afinidad de unión como se especifica en esta solicitud, independiente del método usado para obtener la proteína. Por ejemplo, la proteína puede ser un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo o cualquier molécula que tenga una especificidad de unión como se especifica en esta solicitud.

El polipéptido PAMG-1 separado de los líquidos corporales producido de manera recombinante o por síntesis química y los fragmentos u otros derivados o análogos del mismo, incluyendo proteínas de fusión, puede usarse como un inmunógeno para generar anticuerpos que reconozcan el polipéptido PAMG-1. Dichos anticuerpos incluyen, pero sin limitación, policlonales, monoespecíficos, monoclonales, quiméricos, monocatenarios, fragmentos de Fab y bibliotecas de expresión de Fab. Los anticuerpos anti-PAMG-1 de la invención pueden presentar reacción cruzada, por ejemplo, pueden reconocer la PAMG-1 de diferentes especies. Los anticuerpos policlonales tienen mayor probabilidad de presentar reactividad cruzada. De manera alternativa, un anticuerpo de la invención puede ser específico para una única forma de PAMG-1. Preferiblemente, dicho anticuerpo es específico para la PAMG-1 humana.

Para la producción de anticuerpos policlonales contra el polipéptido PAMG-1 o derivado o análogo del mismo pueden usarse diversos procedimientos conocidos en la técnica. Para la producción de anticuerpos, pueden inmunizarse diversos animales hospedadores por inyección con el polipéptido PAMG-1 o un derivado (por ejemplo, un fragmento o una proteína de fusión) del mismo, incluyendo pero sin limitación conejos, ratones, ratas, ovejas, cabras, etc. El polipéptido PAMG-1 o fragmento del mismo puede conjugarse con un soporte inmunogénico, por ejemplo, albúmina de suero bovina (BSA) o hemocianina de lapa californiana (KLH). Para aumentar la respuesta inmunológica pueden usarse diversos adyuvantes dependiendo de la especie hospedadora, incluyendo pero sin limitación adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes potencialmente útiles en seres humanos tales como BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el polipéptido PAMG-1 o fragmento, análogo o derivado del mismo, puede usarse cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas del anticuerpo mediante líneas celulares en cultivos continuos. Esto incluye pero sin limitación la técnica del hibridoma originalmente desarrollada por Kohler y Milstein (*Nature* 1975,256: 495-497), así como la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de célula B humana (Kozbor et al., *Immunology Today* 1983, 4: 72; Cote et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1983, 80: 2026-2030) y la técnica de hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96,1985). Pueden producirse anticuerpos monoclonales en animales sin gérmenes (Publicación de Patente Internacional N° WO 89/12690), publicada el 28 de diciembre de 1989). De hecho, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., *J. Bacterid.* 1984, 159: 870; Neuberger et al., *Nature* 1984, 312: 604-608; Takeda et al., 1985, *Nature* 314:452-454) por corte y empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón específica para un polipéptido PAMG-1 junto con genes de una molécula de anticuerpo humana de actividad biológica apropiada; dichos anticuerpos se encuentran dentro del alcance de esta invención. Estos anticuerpos quiméricos humanos o humanizados se prefieren para usar en terapia de enfermedades o trastornos en seres humanos (descritos anteriormente), ya que los anticuerpos humanos o humanizados son mucho menos propensos que los anticuerpos xenogénicos a inducir una respuesta inmune, en particular una respuesta alérgica ellos mismos.

Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (Patentes de Estados Unidos N°: 5.476.786 y 5.132.405 de Huston; Patente de Estados Unidos N° 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos monocatenarios específicos contra el polipéptido PAMG-1. De hecho, estos genes pueden suministrarse para la expresión *in vivo*. Una realización adicional de la invención utiliza las técnicas descritas para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (Huse et al., Science 1989, 246: 1275-1281) para permitir la identificación rápida y sencilla de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para un polipéptido PAMG-1 o sus derivados o análogos.

Los fragmentos de anticuerpos que contienen el idiotipo de la molécula de anticuerpo pueden generarse por técnicas conocidas. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen pero sin limitación: el fragmento F(ab)₂ que puede producirse por digestión con pepsina de la molécula del anticuerpo; los fragmentos Fab que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro del fragmento F(ab)₂ y los fragmentos Fab se pueden generarse tratando la molécula de anticuerpo con papaina y un agente de reducción.

En la producción de anticuerpos, la selección del anticuerpo deseado puede conseguirse por técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, radioinmunoensayo, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos "sandwich", ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ* (usando oro coloidal, marcas enzimáticas o radioisótopos, por ejemplo), transferencias de western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo, ensayos de aglutinación en gel, ensayos de hemaglutinación), ensayos de fijación del complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A y ensayos de inmunoelectroforesis, etc. La unión al anticuerpo se puede detectar detectando una marca en el anticuerpo primario. El anticuerpo primario se puede detectar detectando la unión de un anticuerpo secundario o un reactivo con el anticuerpo primario. El anticuerpo secundario puede estar marcado. En la técnica se conocen muchos medios para detectar la unión en un inmunoensayo y están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, para seleccionar anticuerpos que reconocen un epítipo específico de un polipéptido PAMG-1, pueden ensayarse hibridomas generados para un producto que se une a un fragmento del polipéptido PAMG-1 que contiene dicho epítipo. Para la selección de un anticuerpo específico contra un polipéptido PAMG-1 de una especie animal en particular, puede seleccionarse basándose en la unión positiva con el polipéptido PAMG-1 expresado por o aislado de células de esta especie animal.

Anticuerpos Específicos

Líneas de células de hibridoma se producen por el siguiente procedimiento. En primer lugar, se inmunizan con PAMG-1 ratones que tienen células B esplénicas y de ganglio linfático. Los hibridomas se producen entonces para inmortalizar las células B. Las células B pueden ser células B esplénicas y/o de ganglio linfático. Estos hibridomas, que producen un anticuerpo monoclonal que tienen una afinidad de unión por PAMG-1, se identifican después en un ELISA: primera capa: PAMG-1; segunda capa: sobrenadante del hibridoma; y tercera capa: conjugado de anticuerpos de conejo anti-ratón marcados con peroxidasa de rábano picante. Estos hibridomas identificados se cultivan después *in vitro* o en ascites y los anticuerpos monoclonales producidos se aíslan. Los anticuerpos pueden ser de hibridomas N52, N271 y N42 depositados en el Depósito de la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales con los números de acceso VKPM H-92, VKPM H-93 y VKPM H-94, respectivamente.

Métodos y Dispositivos para Detectar la PAMG-1

La presente invención establece que la PAMG-1, particularmente la PAMG-1 presente en el líquido amniótico en cantidades mucho más elevadas que en el líquido vaginal, y es un analito útil para detectar la rotura de la membrana fetal que produce la pérdida de líquido amniótico en la vagina. En otras palabras, permite diagnosticar la rotura prematura de las membranas, es decir, del saco amniótico. La invención establece adicionalmente límites para detectar la PAMG-1 en condiciones normales, diversos síntomas de vaginitis y rotura verdadera de membranas. Identificados el analito y los niveles relativos que indican la rotura de membranas, un experto habitual en la materia puede después emplear, para ventaja total, cualquier técnica analítica conocida para la detección de proteínas para determinar si en un paciente se ha producido un estado de rotura prematura de membrana.

De acuerdo con la invención, el inmunoensayo, particularmente el ensayo inmunocromatográfico, constituye una técnica preferida y más adelante se expone con detalle un inmunoensayo. Estos ensayos tienen la ventaja de ser específicos, precisos, rápidos y económicos.

Para detectar la unión de acuerdo con la presente invención pueden usarse diversos medios conocidos en la técnica para detectar la unión inmuno-específica de un anticuerpo a un antígeno. Un método anterior para detectar la interacción entre un antígeno y un anticuerpo implicado en el análisis del complejo es por precipitación en geles. Un método adicional para detectar un par de unión de anticuerpos detector de analitos incluye el uso de anticuerpos detectores radio ionizados o una proteína radio ionizada que reacciona con IgG, tal como la Proteína A. Los expertos en la materia conocen bien estos métodos anteriores, como se revisa en *Methods in Enzymology*, 1980, v. 70, págs. 166-198. Seleccionando un anticuerpo y las condiciones que producen un resultado positivo por encima de los

valores umbral para la PROM que se describe en la presente memoria, se puede emplear esta tecnología en la práctica de la invención.

5 Los métodos posteriores para determinar la presencia de un analito en una muestra usan únicamente un anticuerpo incluido en ensayos de unión competitiva. En esta técnica, el anticuerpo que la mayoría de la veces se inmovilizaría sobre un soporte sólido, se expondría a una muestra que se sospecha que contiene el analito junto con una cantidad conocida de analito marcado. Los dos analitos, el analito marcado y el analito en la muestra podrían competir de esta manera por los sitios de unión al anticuerpo. Tanto en el analito no marcado como en el analito marcado unido se determina y a partir de esta medición se conoce la cantidad de analito competitivo en la muestra. Una descripción más completa de este método se describe en "Basic Principles of Antigen-Antibody Reaction", Elvin A. Labat, (Methods in Enzymology, 70, 3-70,1980). En este ejemplo el analito marcado puede marcarse tanto con un radioisótopo como con una marca enzimática.

15 Inmunoensayos más recientes utilizan un método de anticuerpo doble para detectar la presencia de un analito. Estas técnicas también se revisan en el volumen Methods in Enzymology indicado anteriormente. Por lo tanto, de acuerdo con una realización de la presente invención, la presencia de marcadores individuales se determina usando un par de anticuerpos para cada uno de los marcadores a detectar. En la presente memoria, un anticuerpo de este par se denomina "anticuerpo detector" y el otro anticuerpo de este par se denomina "anticuerpo de captura". Una realización de la presente invención por tanto usa el método sándwich (intercalado) de anticuerpo doble para detectar la PAMG-1 en una muestra de líquido vaginal. En este método, el analito se intercala entre el anticuerpo detector y el anticuerpo de captura, inmovilizándose de manera irreversible el anticuerpo de captura sobre un soporte sólido. El anticuerpo detector contendría una marca detectable, para identificar la presencia del intercalado anticuerpo-analito y por tanto la presencia del analito.

25 Las primeras formas comunes de soportes sólidos incluyen placas, tubos o perlas de poliestireno, todas ellas bien conocidas en el campo de radioinmunoensayo e inmunoensayo enzimático. Más recientemente, se han empleado varios materiales porosos tales como nylon, nitrocelulosa, acetato de celulosa, fibras de vidrio y otros polímeros porosos como soportes sólidos.

30 Por tanto, en una realización específica, el dispositivo utilizado en la invención comprende medios para realizar un ensayo inmunocromatográfico ("dispositivo de ensayo inmunocromatográfico"). Dicho dispositivo comprende un medio en fase sólida para conducir un líquido. Cómo se usa en este documento, la expresión "fase sólida significa para conducir un líquido" se refiere a un soporte sólido que permite la migración de un líquido a través del mismo, por ejemplo, mediante acción capilar. Un producto típico de esta naturaleza es una membrana de nitrocelulosa, que puede prepararse por métodos que conocen bien los expertos en la materia.

35 En la técnica se conocen muchos medios y formatos de ensayo inmunocromatográficos y pueden usarse en la práctica de la presente invención. Los ensayos inmunocromatográficos que usan una membrana como un soporte sólido en una varilla o dispositivo de paso de flujo se establecen bien para usar en el laboratorio clínico y para ensayar en sitios alternativos, es decir, fuera del laboratorio. La presentación habitual para un dispositivo de ensayo inmunocromatográfico es una membrana (celulósica o no celulósica) contenida en un soporte de plástico. El soporte de plástico mantiene la membrana en una configuración adecuada para asegurar el correcto funcionamiento de todo el dispositivo. Existen muchas variaciones de la estructura básica de los dispositivos de ensayo. Por ejemplo, Litman et al. (Patentes de Estados Unidos N° 5.156.952 y 5.030.558) describen un método y dispositivo de ensayo para determinar la presencia de una cantidad mínima de un analito en una muestra. Ullman et al. (Patentes de Estados Unidos N° 5.137.808 y 4.857.453) describen un dispositivo para alojar una membrana de ensayo que incluye reactivos líquidos independientes para ayudar al flujo de la muestra. Daffom et al. (Patente de Estados Unidos N° 4.981.768) describe un dispositivo con puertos para aplicar muestras y líquidos adicionales. Corti et al. (Solicitud de Patente Europea N° 89118378.2), Greenquist et al. (Patente de Estados Unidos N° 4.806.312) y Berger et al. (U Patente de Estados Unidos N° 5.114.673) también describen dispositivos de ensayo.

40 Preferiblemente, los medios de ensayo inmunocromatográficos incluyen un control para indicar que el ensayo se ha realizado correctamente. El control puede ser un reactivo de unión específico en un sitio más distal desde el punto de aplicación de la muestra en el soporte de fase sólida que la zona de detección que se unirá al reactivo marcado en presencia o ausencia del analito, indicando por tanto que el receptor movable ha migrado una distancia suficiente con la muestra líquida para proporcionar un resultado significativo.

45 Los marcadores adecuados para usar en ensayos inmunocromatográficos incluyen enzimas, fluoróforos, cromóforos, radioisótopos, colorantes, oro coloidal, carbono coloidal, partículas de látex y agentes quimioluminiscentes. Cuando se emplea un marcador de control, puede usarse el mismo marcador o diferente marcador para el receptor y para el marcador del control.

50 Puede utilizarse un dispositivo de inmunoensayo de tipo paso de flujo. Valkirs et al. (Patente de Estados Unidos N° 4.632.901) describen un dispositivo que comprende anticuerpos, específicos contra un analito antigénico, unido a una membrana porosa o filtro al cual se añade una muestra líquida. Como el líquido fluye a través de la membrana,

65

los analitos diana se unen al anticuerpo. Después de añadir la muestra se añade un anticuerpo marcado. La detección visual del anticuerpo marcado proporciona una indicación de la presencia del analito diana en la muestra.

5 Kromer et al. (documento EP-A 0 229 359) describen otro ejemplo de un dispositivo de paso de flujo, que describe un sistema de suministro de reactivo que comprende una matriz saturada con un reactivo o componentes de los mismos dispersos en un polímero hidrosoluble para controlar la velocidad de disolución del reactivo para suministrar a una matriz de reacción situada por debajo de la matriz.

10 En los ensayos de tipo migración, el soporte de la fase sólida, por ejemplo, la membrana, se impregna con los reactivos necesarios para analizar el ensayo. Se proporciona una zona de detección del analito en la que el analito marcado está unido y se leen los resultados de este ensayo. Por ejemplo, véase Tom et al. (Patente de Estados Unidos N° 4.366.241) y Zuk (documento EP-A 0 143 574). Los dispositivos de ensayo por migración normalmente incorporan dentro de ellos reactivos que se han unido a marcas de color tales como oro o carbono coloidal, permitiendo por lo tanto la detección visible de los resultados del ensayo sin la adición de sustancias adicionales. Véase, por ejemplo, Bernstein (Patente de Estados Unidos N° 4.770.853), May et al. (documento WO 88/08534) y Ching et al. (documento EP-A 0 299 428). Todos estos tipos de dispositivos de paso de flujo conocidos pueden usarse de acuerdo con la presente invención.

20 Los marcadores directos son un ejemplo de marcadores que pueden usarse en ensayos inmunocromatográficos de acuerdo con la presente invención. Un marcador directo se ha definido como una entidad, que en su estado natural, es fácilmente visible, a simple vista, o con la ayuda de un filtro óptico y/o estimulación aplicada, por ejemplo, luz UV (ultravioleta) para promover fluorescencia. Los ejemplos de marcadores teñidos que pueden usarse de acuerdo con la presente invención, incluyen partículas de sol metálicas, por ejemplo, partículas de sol de oro tales como las descritas por Leuving (Patente de Estados Unidos N° 4.313.734); partículas de sol de tinción tales como las descritas por Gribnau et al. (Patente de Estados Unidos N° 4.373.932) y May et al. (documento WO 88/08534); látex teñido tal como se describe por May, anteriormente, Snyder (documentos EP-A 0 280 559 y 0 281 327); o colorantes encapsulados en liposomas como describen Campbell et al (Patente de Estados Unidos N° 4.703.017). Otros marcadores directos incluyen un radionúclido, un resto fluorescente o un resto luminiscente. Además de estos dispositivos de marcación directa, también pueden usarse marcadores indirectos que comprenden enzimas de acuerdo con la presente invención. En la técnica se conocen diversos tipos de inmunoensayos ligados a enzimas, por ejemplo, fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano picante, lisozima, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, ureasa, éstos y otros se han discutido con detalle por Eva Engvall en Enzyme Immunoassay ELISA y EMIT en Methods in Enzymology, 70.419-439, 1980 y en la Patente de Estados Unidos N° 4.857.453.

35 El dispositivo de diagnóstico utilizado en la presente invención puede comprender una membrana ensamblada que tiene una sección de detección próxima al punto de introducción de la muestra y una sección de captura aguas abajo desde esta posición. La sección detectora contiene anticuerpos (anticuerpos detectores), que reaccionarán con PAMG-1 en la muestra. Los anticuerpos detectores se inmovilizan de manera reversible sobre la membrana y migrarán con la muestra, durante el uso. Es preferible aunque no esencial, que los anticuerpos detectores estén marcados, por ejemplo, con un radionúclido, una enzima, un resto fluorescente, un resto luminiscente o una marca teñida tales como los descritos en la técnica anterior e indicados anteriormente. Específicamente, podría emplearse una marca radioactiva, de manera que por ejemplo, el anticuerpo pareciera dorado antes de capturar el antígeno y cambiara a púrpura después de la captura.

45 La sección de captura que, como se ha indicado, está aguas de la sección detectora, comprende anticuerpos de captura, que se inmovilizan irreversiblemente sobre el soporte sólido, cada anticuerpo se inmoviliza en una localización diferente en la sección de captura. Los anticuerpos y los reactivos necesarios se inmovilizan sobre el soporte sólido usando técnicas convencionales reconocidas en la técnica, como se describe en los dispositivos de inmunoensayo de tipo paso de flujo descritos anteriormente. En general, los anticuerpos se absorben sobre los soportes sólidos como resultado de interacciones hidrófobas entre subestructuras de proteínas no polares y el material de la matriz de soporte no polar.

50 Una particular ventaja de la tecnología del ensayo inmunocromatográfico de la presente invención es que supera la incapacidad de estos ensayos para proporcionar datos cuantitativos. Por tanto, la sección de captura puede contener una mezcla de anticuerpos inmovilizados específicos para PAMG-1, de manera que solamente se produce una señal cuando la cantidad de PAMG-1 en la muestra supera el umbral de detección deseado.

60 Además, pueden usarse formatos de inmunoensayo homogéneos. Un ejemplo de dicho método homogéneo competitivo se encuentra en la Patente de Estados Unidos N° 3.817.837 de Rubenstein y Ullman, que describen una técnica en la que el ligando y el ligando unido a la enzima compiten por los sitios de unión al anticuerpo. Como la unión del anticuerpo al ligando unido a la enzima modifica su actividad enzimática, la concentración del ligando presente puede estimarse midiendo la velocidad a la cual dicha mezcla convierte el sustrato en producto. Por tanto, en un método homogéneo, la propiedad detectable del marcador es inherentemente diferente dependiendo de si está unido o no unido. En este estado unido, el marcador tendrá mayor o menor intensidad de señal. Normalmente, la unión del anticuerpo al ligando marcado causa una disminución de la intensidad de la señal, por ejemplo, cuando el marcador es una enzima. Los productos típicos en esta categoría incluyen la línea EMIT de inmunoensayos

enzimáticos de Syva Company y la línea TDX de inmunoensayos de polarización fluorescente de Abbott Diagnostics. Se podría preparar un ensayo homogéneo particular colocando todos los analitos en perlas, en cuyo caso la muestra se introduciría y las perlas posteriormente se centrifugarían y se detectarían.

5 Otros ejemplos de dispositivos de diagnóstico biológico que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen los dispositivos descritos por G. Grenner, P.B. Diagnostics Systems, Inc. en las Patentes de Estados Unidos N° 4.906.439 y 4.918.025. El dispositivo de Grenner de la patente 4.906.439 comprende un elemento de ensayo de diagnóstico y una unidad de aplicación de la muestra que comprende un elemento de suministro de líquido que se caracteriza por tener una capa con una pluralidad de surcos para el suministro de la muestra al elemento del ensayo. El dispositivo de Grenner de la patente 4.918.025 se refiere a un dispositivo que incluye un medio de introducción de muestras tal como una membrana adyacente en la que se coloca un capilar que contiene un reactivo fijado y un depósito de líquido residual. La liberación del reactivo fijado del capilar completa la reacción después de depositar la muestra y el líquido sobrante se conserva en el depósito residual de manera que el dispositivo es independiente.

15 Aunque se prefiere la medición con una membrana, debe entenderse que pueden usarse del mismo modo otras técnicas y dispositivos detectores correspondientes de manera similar al anterior. Actualmente se dispone de varios tipos de aparatos para ensayos automatizados, que pueden realizar un ensayo de varias muestras al mismo tiempo. Estos aparatos de ensayo automatizados incluyen aparatos de ensayo de acceso continuo/aleatorio. Los ejemplos de dichos sistemas incluyen OPUS™ de PB Diagnostics System, Inc y el Analizador IMX™ introducido por Abbott Laboratorios del Norte de Chicago III en 1988. En general, en un vaso de muestras se proporciona típicamente una muestra del líquido del ensayo y todas las etapas del proceso incluyendo el pipeteado de la muestra en el elemento del ensayo de la prueba, la incubación y la lectura de la señal obtenida se realizan automáticamente. Los sistemas de ensayos automatizados generalmente incluyen una serie de estaciones de trabajo realizando cada una de ellas una de las etapas en el procedimiento del ensayo. El elemento del ensayo puede trasladarse desde una estación de trabajo a la siguiente por diversos medios tales como una bandeja circular o una rejilla movable para permitir que las etapas del ensayo se realicen secuencialmente. Los elementos del ensayo también pueden incluir depósitos para almacenar reactivos, líquidos de mezcla, muestras de dilución, etc. Los elementos del ensayo también incluyen una abertura para permitir la administración de una cantidad predeterminada de un líquido de muestra, y si fuera necesario, cualquier otro reactivo necesario a un miembro poroso. El elemento de la muestra también puede incluir una ventana que permita leer una señal obtenida como resultado de las etapas del proceso, típicamente un cambio fluorescente o colorimétrico de los reactivos presentes en el miembro poroso, tal como por medio de un espectroscopio o un fluorímetro, que se incluyen dentro del sistema del ensayo. Los instrumentos de ensayo automatizados de PB Diagnostic Systems, Inc. se describen en las Patente de Estados Unidos N° 5.051.237; 35 5.138.868; 5.141.871 y 5.147.609.

Otras clases de sistemas de analizadores inmunoquímicos que pueden usarse en la práctica de la presente invención son los biosensores o sistemas ópticos inmunosensores. En general, un biosensor óptico es un dispositivo que usa principios ópticos cuantitativamente para convertir concentraciones químicas o bioquímicas o actividades de interés en señales eléctricas. Estos sistemas pueden agruparse en cuatro categorías principales: técnicas de reflexión; resonancia de plasmón superficial; técnicas de fibra óptica y dispositivos ópticos integrados.

Las técnicas de reflexión incluyen elipsometría, espectroscopía por reflexión integral múltiple y dispositivos de relleno de capilar fluorescente. Las técnicas de fibra óptica incluyen fluorescencia de campo evanescente, tubo capilar de fibra óptica y sensores de fluorescencia óptica de fibra. Los dispositivos ópticos integrados incluyen fluorescencia de campo evanescente plana, inmunosensor acoplador de graduación de entrada, interferómetro Mach-Zehnder, interferómetro Hartman y sensores de interferómetro de diferencia. La detección holográfica de las reacciones de unión se consiguen detectando la presencia de una imagen holográfica que se genera en un sitio de imagen predeterminado cuando un reactivo de un par de unión se une a un segundo reactivo inmovilizado del segundo par de unión (véase la Patente de Estados Unidos N° 5.353.582, presentada el 4 de octubre de 1994 por Lichtewalter et al.). Se describen ejemplos de inmunosensores ópticos en general en un artículo de revisión de G. A. Robins (Advances in Biosensors), Vol. 1, págs. 229-256, 1991. La descripción más específica de estos dispositivos se encuentra por ejemplo en las Patente de Estados Unidos N° 4.810.658; 4.978.503; y 5.186.897; R. A. Brady et al. (Phil. Trans. R. Soc. Land. B 316,143-160,1987) y G. A. Robinson et al. (en Sensors and Actuators, Elsevier, 1992).

55 Los métodos de la presente invención pueden incorporarse y practicarse dentro de una diversidad de sistemas de medición ópticos. Específicamente, un formato de inmunoensayo es capaz de realizarse en una diversidad de sistemas de detección optoelectrónicos. Más particularmente, ya se conocen diversas tecnologías de inmunosensores ópticos que pueden facilitarse e implementarse en la práctica de la presente invención. Por tanto, todos los dispositivos y técnicas tales como, por ejemplo, técnicas de reflexión, resonancia de plasmón superficial, técnicas de guías de onda de fibra óptica y dispositivos ópticos integrados, pueden adoptarse y configurarse específicamente para detectar y presentar los resultados del análisis de una secreción vaginal de un paciente de acuerdo con el presente método. Las técnicas de reflexión en particular, tales como reflectometría y elipsometría y el uso específico de fibras ópticas, guías de onda óptica, dispositivos de relleno capilar fluorescente y biosensores 65 ópticos integrados, presentan unas cuantas variantes de las técnicas y equipamiento que pueden emplearse. Una

revisión general de estos dispositivos puede encontrarse en Robinson, G. A., *Optical Lnmunosensors: An Overview*, *Advances in Biosensors*, Vol. 1, pp. 229-256 (1991).

5 Más particularmente, la elipsometría se basa en la dirección de un haz de luz polarizada primero contra una superficie de referencia (un patrón) y después contra la superficie de la muestra, continuando con una comparación de la naturaleza y grado de las reflexiones resultantes que pueden realizarse. Particularmente, la unión del analito a las moléculas receptoras se medirá como una cadena del espesor de la superficie con respecto a la superficie de referencia.

10 En el caso de espectroscopia múltiple de reflexión interna, por ejemplo, el ligando y su receptor pueden estar covalentemente inmovilizados en la superficie óptica de una guía de onda plana, de cuarzo fundido, después de lo cual un rayo de luz puede reflejarse internamente dentro de la guía de onda y penetraría en una solución adyacente a la guía de onda, de manera que podrían medirse las diferencias refractarias como entre el patrón y la muestra. En este formato particular, puede asociarse una muestra fluorescente y tomarse las mediciones de fluorescencia resultantes para determinar el grado de unión presente.

15 Una técnica adicional utiliza la tecnología conocida como dispositivo de relleno capilar fluorescente. En esta tecnología particular, se utilizan dos placas de vidrio separadas por un espacio de dimensión capilar. Las moléculas receptoras pueden inmovilizarse sobre la base de la placa, que también actúa como una guía de onda óptica. Pueden realizarse ensayos competitivos o sándwich utilizando el marcado con FITC y la fluorescencia inducida se acopla en la guía de onda con señal de fuentes unidas a diferencia de no unidas. Dicha señal se discrimina por su divergencia angular después de salir de la guía de onda. También se han preparado dispositivos de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) que funcionan en respuesta al acoplamiento de incidencia de luz sobre una película metálica fina en modos de superficies asociados a oscilaciones electrónicas colectivas dentro de la película metálica.

20 La condición resonante depende de las características ópticas de la película metálica, de su espesor, de los índices refractarios dieléctricos en ambos lados de ella o del ángulo de incidencia de la luz. Las moléculas receptoras se unen al lado superior de la película metálica, y la luz se dirige al lado inferior de la película, como a través de un prisma de sustrato. El analito diana, cuando se une a estos receptores, producirá una modificación del estado de resonancia debido al cambio que produce en el índice refractario local. La resonancia se observa controlando la intensidad de luz reflejada según varíe el ángulo de incidencia en el haz de luz sobre la superficie de la película de metálica. El cambio del ángulo de resonancia se correlacionará directamente con la cantidad de analito unido.

25 Las técnicas que implican sistemas de fibra óptica incluyen la fluorescencia de campo evanescente. En este caso, la funda de revestimiento se elimina del extremo de una fibra óptica, produciendo de esta manera un elemento sensor que interacciona evanescentemente con el medio circundante. Las moléculas receptoras se unen a la superficie de la fibra expuesta, y el ensayo directo puede realizarse utilizando la fluorescencia natural del receptor y de las proteínas conjugadas. Los ensayos competitivos o de sándwich pueden realizarse usando marcaje con FITC para conseguir mayor sensibilidad. Durante el funcionamiento, una onda de luz se acopla en la fibra y una parte de la fluorescencia producida evanescentemente se reacopla en la fibra y se repropaga a un detector.

30 Una técnica adicional que utiliza tecnología de fibra óptica implica el tubo capilar de fibra óptica, en el que una fibra óptica desnuda se encierra dentro de una cámara de relleno cilíndrica, produciendo un elemento sensor que interacciona evanescentemente con la parte del volumen de llenado que rodea inmediatamente la fibra. Las moléculas receptoras pueden unirse a la superficie de la fibra expuesta y pueden realizarse ensayos sándwich o competitivos de desplazamiento. Una onda de luz podría acoplarse dentro de la fibra y una parte de la fluorescencia inducida evanescentemente podría reacoplarse en la fibra y repropagarse a un detector. La señal del analito diana frente a las fuentes de fondo se discrimina por su divergencia angular después de salir de la fibra. Otras técnicas de fibra óptica tales como fluorescencia de fibra óptica pueden adaptarse a la presente invención utilizando algunos de los principios enunciados anteriormente.

35 Otras técnicas fotónicas tales como la interferometría incluyen la disposición de una longitud de guía de película fina que tiene, por ejemplo, dos trayectorias, en la primera las moléculas receptoras pueden inmovilizarse mientras que la segunda se blindada para proporcionar un canal de referencia. La luz láser, por ejemplo, puede acoplarse en la guía de onda y dividir las dos trayectorias, de manera que pueden detectarse cambios en el índice de refracción y en el espesor de la cubierta de revestimiento por el resultado de un cambio de fase en el haz que, a su vez, se correlacionará con la cantidad de analito unido. Una variación de esta estrategia se identifica en el interferómetro Hartman, en el que se prepara una guía de onda plana de película fina multimodo de trayectoria simple. Las moléculas receptoras pueden inmovilizarse en esta trayectoria y la luz de un láser puede acoplarse en la longitud de guía de manera que se propagan dos modos hacia abajo de la trayectoria. La óptica geométrica multimodo es tal que el modo de mayor orden tiene un campo evanescente grande, proporcionando un mecanismo de señal y el modo de orden inferior no tiene prácticamente campo evanescente, proporcionando un mecanismo de referencia. La unión con el analito diana producirá cambios relacionados en el índice de refracción y el espesor de la capa de recubrimiento sobre la trayectoria que se detectarán por el campo evanescente del modo de orden superior, produciendo un cambio de fase en este modo. Como el orden inferior o modo de referencia está blindado a dichos cambios, no experimentará cambio de fase y la diferencia medida entre la señal y los haces de referencia podrán correlacionarse para determinar la cantidad del analito unido.

Aunque la descripción anterior ha proporcionado términos tanto generales como con algún detalle, en la práctica de la presente invención pueden adaptarse diversas técnicas disponibles en la tecnología de sensores ópticos. Debe entenderse que lo anteriormente descrito no es en absoluto exhaustivo o limitativo, ya que pueden adoptarse diversas tecnologías existentes, que medirán satisfactoriamente diferencias en la unión y por consiguiente, la presencia y cantidad de los marcadores o analitos de interés en la presente memoria. Por supuesto, como se ha enfatizado anteriormente, no importa la tecnología empleada, la práctica de la invención comprende la detección y la medición simultánea de al menos tres analitos.

10 **Métodos Inmuncromatográficos para Detectar la PAMG-1**

A continuación se describen realizaciones de los métodos para detectar la PAMG-1 de acuerdo con la presente invención.

15 En una realización del método, la PAMG-1 se detecta en una muestra de secreción vaginal mediante el contacto de la muestra que contiene PAMG-1 con un sistema de inmunoensayo para formar un complejo anticuerpo-PAMG-1. Por tanto se detecta el complejo anticuerpo-PAMG-1. En una variación de esta realización, el anticuerpo incluye un marcador detectable, la etapa de detectar el complejo anticuerpo-PAMG-1, que incluye el marcador detectable.

20 En otra realización del método, la PAMG-1 se detecta en una muestra poniendo la muestra en contacto con un anticuerpo que tiene una elevada afinidad de unión específica por la PAMG-1 (como M271, ejemplificado más adelante), formando así el complejo anticuerpo M271-PAMG-1. El complejo después se pone en contacto con un segundo anticuerpo inmovilizado (p.e., como M52). El segundo anticuerpo es inmunológicamente distinto del primer anticuerpo y no presenta reacción cruzada con el primer anticuerpo, de manera que dichos anticuerpos pueden unirse simultáneamente a la molécula de PAMG-1. El anticuerpo inmovilizado se une al complejo móvil anticuerpo PAMG-1 para formar el complejo inmovilizado anticuerpo-PAMG-1 anticuerpo. La PAMG-1 se detecta detectando este complejo heterotrimérico. Como se ha indicado anteriormente, para el reconocimiento inicial de PAMG-1 se usa preferiblemente el anticuerpo con elevada especificidad para PAMG-1.

30 Cuando el método descrito anteriormente incluye el uso de un anticuerpo del par seleccionado marcado con un marcador detectable, una variación del método incluye poner la muestra en contacto con el primer anticuerpo marcado antes de poner en contacto la muestra con el segundo, anticuerpo inmovilizado. En esta variación, el anticuerpo marcado sirve para unirse a PAMG-1 en la muestra. En otra variación más del método incluye las siguientes etapas: añadir una muestra líquida que contiene la PAMG-1 a una región de material poroso con el anticuerpo móvil marcado que permite la migración de los anticuerpos y proteínas a través de la misma, incluyendo la región del anticuerpo un anticuerpo móvil que tiene una elevada especificidad por PAMG-1 dando como resultado la unión del anticuerpo a PAMG-1 para formar un complejo anticuerpo PAMG-1; la migración del complejo a la región de ensayo que contiene un segundo anticuerpo inmovilizado en su interior, en el que el segundo anticuerpo tiene una afinidad de unión por PAMG-1 dando como resultado que el segundo anticuerpo se una al complejo anticuerpo-PAMG-1 marcado para formar un complejo inmovilizado; y detectar el complejo inmovilizado en la región de ensayo.

Otra variación del método, es un ensayo sándwich convencional, en el que un anticuerpo no marcado se inmoviliza en cualquier superficie. La adición de una muestra líquida que contiene la PAMG-1 da como resultado la unión de PAMG-1 con el anticuerpo inmovilizado para formar un complejo anticuerpo PAMG-1. La adición del anticuerpo marcado da como resultado la formación de un complejo inmovilizado compuesto por el anticuerpo marcado- PAMG-1 anticuerpo inmovilizado y la detección de este complejo.

50 De acuerdo con los métodos descritos anteriormente, los anticuerpos pueden incluir un marcador o etiqueta detectable, incluyendo la etapa de detección del complejo anticuerpo PAMG-1- anticuerpo o - PAMG-1 la detección del marcador o etiqueta detectable. Los ejemplos de marcadores detectables que pueden usarse incluyen partículas teñidas, enzimas, colorantes e isótopos radiactivos. El marcador detectable puede ser una partícula teñida de oro, por ejemplo, con un tamaño promedio entre aproximadamente 20 nm y 30 nm, o puede ser peroxidasa de rábano picante.

55 **Dispositivos Ejemplares para Detectar la PAMG-1**

Para detectar la proteína PAMG-1 en una muestra, se considera una diversidad de dispositivos. En las Figuras 1-2 se describe una realización específica del dispositivo utilizado en la presente invención para detectar PAMG-. Los dispositivos utilizados en la presente invención pueden detectar preferiblemente PAMG-1 en una muestra en la que la concentración de PAMG-1 es de aproximadamente entre 5 ng/ml y 50 µg/ml. También se prefiere que los dispositivos tengan un umbral de detección de aproximadamente 5-7 ng/ml. A mayor intervalo entre la concentración de fondo de PAMG-1 y el umbral de sensibilidad del dispositivo de detección, menor posibilidad de resultados positivos falsos. En esta sección, se realizan diferentes realizaciones posibles de dispositivos usados en la presente invención, dentro del dispositivo ilustrado en las Figuras 1, 2. Debe observarse que este dispositivo puede diseñarse para detectar simplemente la presencia de PAMG-1 en una muestra de secreción vaginal.

El término “aproximadamente” como se usa en la presente memoria significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular como determina un experto en la materia, que dependerá en parte de cómo se mida o se determine el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, “aproximadamente” puede significar dentro de 1 o más de 1 desviaciones convencionales, para la práctica en la técnica. De manera alternativa, “aproximadamente” puede significar un intervalo de hasta el 20%, preferiblemente hasta el 10%, más preferiblemente hasta 5% y más preferentemente aún hasta el 1% de un valor determinado. De manera alternativa, particularmente con respecto a los sistemas o procesos biológicos, el término puede significar dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de 5 veces, y más preferiblemente dentro de 2 veces, de un valor. Cuando en la solicitud y en las reivindicaciones se describen valores particulares, a menos que se indique otra cosa, el significado del término “aproximadamente” dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular debe asumirse.

Descripción de un Dispositivo utilizado en la Presente Invención

Con el propósito de proporcionar ejemplos, esta descripción se refiere a anticuerpos monoclonales ejemplificados a continuación. Sin embargo, no es necesario usar estos monoclonales específicos. Como se muestra en las Figuras 1 y 2, el dispositivo comprende un cuerpo a modo de tira compuesto por varios elementos interconectados secuencialmente. Más específicamente, la parte 12 del dispositivo comprende una almohadilla, que contiene la región 10 del anticuerpo M271, en la cual los anticuerpos M271 están marcados, por ejemplo, por partículas SP teñidas (no mostrado en los dibujos). La almohadilla 12 puede fabricarse con tejido de fibra de vidrio o con cualquier otro material, que sea poroso y permita la migración de diversas partículas y sustancias de una muestra. Las partículas teñidas pueden comprender partículas de oro con un tamaño promedio dentro del intervalo de 20 a 30 nm. La región del anticuerpo M271 también contiene inmunoglobulina IgG de ratón marcada con las mismas partículas teñidas. Los anticuerpos M271 y la inmunoglobulina IgG de ratón marcados se introducen en la parte de la banda 10 de la almohadilla 12 impregnando la almohadilla 12 con una solución de anticuerpos IgG de ratón marcados. La solución de anticuerpos M271 y la inmunoglobulina IgG de ratón puede introducirse en una membrana de nitrocelulosa 22 usando un dispositivo en forma de rotulador o microgotero. Conectado a un extremo de la almohadilla 12 en su dirección longitudinal existen una membrana(o membranas) de nitrocelulosa 22, que contienen una región de ensayo 14 y una región de control 16. Tanto la región de ensayo 14 como la región de control 16 se disponen transversalmente al dispositivo en toda su anchura. La región de ensayo 14 es una parte de la banda de la membrana de nitrocelulosa 22. La región de ensayo 14 contiene anticuerpos M52 unidos a la membrana de nitrocelulosa 22. La región de control 16 contiene anticuerpos anti anti inmunoglobulina de ratón unidos a la membrana de nitrocelulosa 22. La región de control 16 atraviesa todo el ancho de la tira 22. Una membrana de papel de filtro 24 se conecta al extremo de la membrana de nitrocelulosa 22, que es opuesta al extremo de la membrana de nitrocelulosa 22 conectada a la almohadilla 12. Una membrana de papel de filtro 24 se conecta al extremo de la tira de nitrocelulosa 22 en su dirección longitudinal. La superficie del dispositivo está cubierta con películas protectoras especiales 28 y 30, por ejemplo, finas cintas adhesivas especialmente diseñadas para dispositivos de tiras. Las flechas 18 dibujadas sobre la superficie de la película 28 son para mostrar la aplicación de la muestra en el extremo de la almohadilla 12. La almohadilla 12, la membrana de nitrocelulosa 22 y la tira de papel de filtro 24 se unen a una base adhesiva de plástico rígido 26.

Leyendas de las Figuras 1 y 2

10 - región del anticuerpo M271;
 12 - almohadilla;
 14 - región de ensayo;
 16 - región de control;
 18 - flechas;
 22 - membrana de nitrocelulosa;
 24 - membrana de papel de filtro;
 26 - base adhesiva de plástico rígido;
 28 - película protectora parcialmente transparente con flechas;
 30 - película protectora no transparente.

Realización Preferida del Dispositivo utilizado en la Presente Invención

En la realización descrita en esta sección, el dispositivo incluye una región de almohadilla de anticuerpo M271 10 formada de una matriz de aplicación de muestra porosa que permite que los anticuerpos y las proteínas migren a través de ella. La región del anticuerpo M271 10 incluye el anticuerpo M271, que es capaz de unirse muy específicamente a PAMG-1.

La introducción de la muestra líquida conteniendo PAMG-1 en la región del anticuerpo M271 produce la adhesión del anticuerpo M271 a PAMG-1 para formar el complejo anticuerpo M271-PAMG-1. El dispositivo también incluye una región de ensayo 14 en conexión fluida con la región del anticuerpo M271 10 formada de un material poroso que permite que los anticuerpos y las proteínas migren a lo largo de la misma. Esta región de ensayo 14 incluye el anticuerpo M52 inmovilizado en la región de ensayo 14 que también es capaz de unirse a PAMG-1. El anticuerpo M52 es inmunológicamente distinto del anticuerpo M271 de manera que los anticuerpos M271 y M52 pueden unirse

simultáneamente a PAMG-1. La introducción de una muestra líquida en la región del anticuerpo M271 10 da como resultado la migración del complejo anticuerpo M271-PAMG-1 en la región de ensayo 14 en la que el complejo anticuerpo-M271-PAMG-1 se une al anticuerpo M52 y se inmoviliza en la región de ensayo por el anticuerpo M52. El dispositivo detecta PAMG-1 en una muestra basándose en la presencia del anticuerpo M52 inmovilizado en la región de ensayo 14. De acuerdo con esta realización, los dos anticuerpos son anticuerpos de acuerdo con la presente invención. Un experto en la materia puede reproducir el procedimiento de selección del par de anticuerpos descritos anteriormente. Como resultado, únicamente PAMG-1 forma un complejo anticuerpo M271-PAMG-1 anticuerpo M52 que se inmoviliza en la región de ensayo 14, por tanto la presencia del anticuerpo M52 inmovilizado en la región de ensayo 14 indica la presencia de PAMG-1 en la muestra.

En esta realización del dispositivo, el anticuerpo M271 está adherido a un marcador detectable que se usa para detectar PAMG-1 inmovilizado en la región del ensayo 14. Los ejemplos de los marcadores detectables que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, partículas teñidas, enzimas, colorantes, colorantes fluorescentes e isótopos radiactivos. En una realización, el marcador detectable son partículas de oro que tienen una dimensión promedio entre aproximadamente 20-30 nm. En una realización, el anticuerpo M271 es un anticuerpo etiquetado en un estado liofilizado.

En una variación de la realización en la que el anticuerpo M271 y la región de almohadilla del anticuerpo M271 está etiquetada con un marcador detectable, el dispositivo incluye adicionalmente la región de ensayo, que contiene el anticuerpo M52. La región almohadilla y la región de ensayo están en comunicación fluida.

En otra realización del dispositivo, contenido también dentro del dispositivo ilustrado en las Figuras 1-2, el dispositivo tiene un cuerpo a modo de tira con extremos proximales y distales. La región del anticuerpo M271 10 del cuerpo de tipo tira está fabricado de un material que permite que los anticuerpos y las proteínas migren a través del mismo. La región del anticuerpo M271 10 del cuerpo a modo de tira incluye el anticuerpo M271, que tiene una elevada afinidad de unión específica para PAMG-1, la introducción del anticuerpo M271 en la región de almohadilla de una muestra líquida que contiene PAMG-1, da como resultado la adhesión del anticuerpo M271 a PAMG-1 para formar el complejo anticuerpo M271-PAMG-1.

El cuerpo de tipo tira también incluye una región de ensayo 14, que está próxima a la región del anticuerpo M271 10 y está en conexión fluida con la región 10 del anticuerpo M271. La región de ensayo 14 está formada de un material que permite que los anticuerpos y proteínas migren a través de la misma. La región de ensayo 14 incluye el anticuerpo M52 inmovilizado en la región de ensayo 14, que tiene una afinidad de unión por PAMG-1, la introducción de la muestra líquida a la región del anticuerpo M271 10 da como resultado la migración del complejo anticuerpo M271-PAMG-1 a la región de ensayo 14 cuando el complejo anticuerpo M271-PAMG-1 se une al anticuerpo M52 y se inmoviliza en la región de ensayo 14 por el anticuerpo M52. La región de ensayo también incluye el anticuerpo M42 y el anticuerpo M52 inmovilizados en la región de ensayo 14. Los anticuerpos M52 y M42 no etiquetados en combinación permiten el ajuste del umbral de sensibilidad del dispositivo de tira de la presente invención (Ejemplo 11). El dispositivo detecta PAMG-1 en una muestra basándose en la inmovilización del complejo de anticuerpo M271-PAMG-1 en la región de ensayo 14.

Región de Control. El dispositivo utilizado en la invención incluye una región de control convencional 16 (Figuras 1 y 2). Esta región de control sirve para confirmar el correcto funcionamiento del dispositivo. Debe observarse, sin embargo, que también puede usarse cualquier diseño de región de control alternativo con el dispositivo utilizado en la presente invención.

El dispositivo con una región de control incluye la región 10 del anticuerpo M271 formada de un material que permite que los anticuerpos y proteínas migren a través de la misma, la región 10 del anticuerpo M271 incluye un anticuerpo M271 marcado que no está inmovilizado en su interior y tiene una elevada especificidad por PAMG-1, la introducción del anticuerpo M271 en la región de la almohadilla 10 de una muestra de líquido conteniendo PAMG-1 da como resultado la unión del anticuerpo M271 a PAMG-1 para formar un complejo anticuerpo M271-PAMG-1. El dispositivo también incluye una región de ensayo 14 en comunicación fluida con la región 10 del anticuerpo M271 que está formada de un material que permite que los anticuerpos y proteínas migren a través de la misma. La región de ensayo 14 también incluye el anticuerpo M52 inmovilizado en la región de ensayo 14 que tiene una afinidad de unión para PAMG-1. El anticuerpo M52 es inmunológicamente distinto del anticuerpo M271 de manera que los anticuerpos M271 y M52 pueden unirse simultáneamente a PAMG-1. La introducción de la muestra líquida en la región 10 del anticuerpo M271 da como resultado la migración del complejo anticuerpo M271-PAMG-1 en la región de ensayo 14 en la que el complejo anticuerpo M271-PAMG-1 se une al anticuerpo M52 y se inmoviliza en la región de ensayo 14 por el anticuerpo M52. El dispositivo detecta PAMG-1 en una muestra basándose en la inmovilización del anticuerpo M271 marcado en la región de ensayo 14. Cuando una concentración baja de PAMG-1 está presente en la muestra, al menos algunos de los anticuerpos M271 marcados migran desde la región 10 del anticuerpo M271 a través de la región de ensayo 14 a la región de control 16. Los anticuerpos anti anti-inmunoglobulina de ratón se inmovilizan en la región de control 16. Los anticuerpos anti-inmunoglobulina se unen a los anticuerpos M271 marcados que tiñen la región de control. Si en una muestra está presente una elevada concentración de PAMG-1, entonces tan solo una pequeña cantidad de anticuerpos M271 marcados pueden alcanzar la región de control 16 y la coloración de la región de control puede ser demasiado débil para ser visible al ojo humano. Para impedir dicha posibilidad, se añadió inmunoglobulina IgG de ratón marcada en la región 10 del anticuerpo M271. Esta inmunoglobulina no se une

a PAMG-1 y migra libremente a través de la región de ensayo 14 del anticuerpo M52 hacia la región de control 16 en la que ésta está unida por anticuerpos anti antiglobulina de ratón y tiñe la región de control 16. La región de control confirma el correcto funcionamiento del dispositivo independientemente de la concentración de PAMG-1 en la muestra.

5 Otro componente más del dispositivo utilizado en la presente invención es un material poroso que está en fuerte conexión porosa con un material de la región de ensayo. Esta parte del dispositivo de la invención funciona como una bomba que ayuda a transportar los líquidos, proteínas y anticuerpos a través del mismo. Los ejemplos de marcadores detectables, que pueden usarse para marcar los anticuerpos de ratón y la inmunoglobulina IgG incluyen, pero sin limitación partículas teñidas, enzimas, colorantes e isótopos radiactivos. En una realización, el marcador detectable es un colorante fluorescente. En otra realización más, los marcadores detectables son partículas teñidas. En una realización, el anticuerpo M271, que es un anticuerpo marcado y la inmunoglobulina IgG de ratón marcada están en estado liofilizado.

15 Los materiales usados en las diversas regiones del dispositivo descrito anteriormente pueden ser cualquier combinación de materiales que permiten la migración de anticuerpos y proteínas a través del mismo. Los ejemplos de materiales adecuados incluyen pero sin limitación fibra de vidrio, plástico poroso, nitrocelulosa y papel de filtro. Las partes del dispositivo pueden colocarse de cualquier combinación funcional siempre que en cualquier realización del dispositivo exista el par de anticuerpos seleccionados que detecte una concentración de fondo mínima de PAMG-1 en la secreción vaginal de una mujer en estado de gestación.

20 El dispositivo utilizado en la presente invención puede incluir opcionalmente una película protectora que cubra al menos una parte del dispositivo. Esta puede ser transparente o no transparente y puede tener marcas/señales informativas, marca registrada o flechas necesarias en su superficie.

25 **Detección de Rotura de Membranas Fetales**

La PAMG-1 está presente en el líquido amniótico a una concentración aproximadamente al menos 100 veces superior que en el suero de mujeres en estado de gestación y al menos 300 veces superior que en la secreción vaginal de mujeres en estado de gestación en ausencia de rotura de membranas fetales. Como resultado, incluso cuando una pequeña cantidad de líquido amniótico (aproximadamente 1/100 de una gota por 1 ml de secreción vaginal) se disuelve en una muestra de secreción vaginal, una cantidad suficiente de PAMG-1 está presente en esta muestra de secreción vaginal para indicar que se ha producido la rotura de la membrana fetal. Además, debido a la baja concentración de PAMG-1 en el suero sanguíneo, la mezcla insignificativa de suero sanguíneo en la muestra (10-15%) no afecta a los resultados que producen los dispositivos y métodos de la presente invención.

Como la presencia de líquido amniótico en una secreción vaginal es indicativa de una rotura de membrana fetal, la detección de PAMG-1 en la secreción vaginal también puede usarse para detectar la rotura de la membrana fetal.

40 El método de acuerdo con la presente invención para detectar la PAMG-1 en el líquido amniótico es muy sensible. Por ejemplo, puede detectarse una concentración de 0,05 ng/ml de PAMG-1 (Ejemplos 6, 7). Como la concentración máxima de PAMG-1 en suero es de aproximadamente 25 ng/ml, en comparación con una concentración mínima de aproximadamente 1680 ng/ml en el líquido amniótico, y como la concentración de fondo de PAMG-1 en la secreción vaginal es muy baja, aproximadamente 0,2 ng/ml, puede usarse un nivel de fondo inferior para PAMG-1 en el método de la presente invención para detectar la aparición de líquido amniótico en la vagina. Usando un umbral de detección inferior en el caso de la presente invención, se impiden la mayoría de resultados falsos.

Los métodos de la presente invención se diseñan para impedir la producción de resultados falsos mediante el uso de un par de anticuerpos que son muy sensibles y específicos para la PAMG-1. Además, el umbral de sensibilidad del dispositivo de la presente invención puede establecerse con precisión al nivel predefinido que está próximo a 7,5 ng/ml.

Como resultado, los métodos de la presente invención no están influenciados por la presencia de vaginitis u otras variables, que tienen un impacto negativo sobre la precisión de métodos anteriores para detectar la rotura de membranas fetales. La concentración máxima de PAMG-1 en un exudado inflamatorio es de 3 ng/ml (Ejemplo 8, Tablas 10, 11). Puede producirse la misma concentración de PAMG-1 si la mezcla de suero sanguíneo con respecto a la secreción vaginal no supera el 10-15%. Además, una gran proporción de concentraciones de PAMG-1 en suero con respecto a líquido amniótico hace que los métodos de la presente invención produzcan probablemente de manera significativa menos resultados positivos falsos debido a la presencia de suero sanguíneo en las secreciones vaginales, incluso con un umbral de detección de PAMG-1 bajo. Como se describe en la presente memoria, los métodos pueden adaptarse para usarse fácilmente de manera rápida y conveniente, haciendo posible por lo tanto que los dispositivos y métodos se usen en condiciones ambulatorias. Por ejemplo, el método puede incorporarse en un dispositivo fácil de usar que un paciente puede hacer funcionar con escasa o ninguna experiencia previa con el dispositivo. Para usar el dispositivo no se requiere especial temporización, dilución o ajuste de las concentraciones de la muestra antes de la medición. Esto hace que el método sea muy fiable y no muy susceptible a un error de funcionamiento. El método también puede diseñarse para permitir una determinación si/no simple de la presencia de PAMG-1 en una muestra y la presencia de líquido amniótico en la vagina.

La presente invención proporciona métodos y utiliza dispositivos para detectar una rotura en una membrana fetal basándose en la presencia de PAMG-1 en la secreción vaginal de una mujer en estado de gestación. Consecuentemente, para detectar la rotura de membranas fetales, el método de la presente invención incluye simplemente la etapa de detectar la presencia de PAMG-1 en la secreción vaginal indicando la aparición de una rotura de las membranas fetales. La parte clave de la presente invención es la selección etapa por etapa del par de anticuerpos que detecta la concentración de fondo muy baja de la proteína PAMG-1 en la secreción vaginal de las mujeres en estado de gestación. Podría esperarse la presencia de PAMG-1 a baja concentración en la secreción vaginal ya que la permeabilidad de la pared capilar para las proteínas sanguíneas depende de modificaciones post-traduccionales de las proteínas y de su interacción con otras moléculas (Marinero J. A. et al: "O-glycosylation delays the clearance of human IGF-binding protein-6 from the circulation" en *European Journal of Endocrinology*, Mayo 2000, Vol 142(5), p 512; Schneeberger E.E.: "Proteins and vesicular transport in capillary endothelium," *Fed Proc* mayo 1983 , Vol. 42(8), págs 2419-24; Minshall RD et al: "Vesicle formation and trafficking in endothelial cells and regulation of endothelial barrier function"; *Histochem Cell Biol* feb 2002; Vol. 117(2), págs. 105-12; Del Vecchio P.J. et al: "Endothelial monolayer permeability to macromolecules"; en *Fed Proc* jun 1987; Vol. 46(8), págs. 2511-5; Siflinger-Birnboim A et al: "Selectivity of the endothelial monolayer: effects on increase permeability"; *Microvascular Research* nov 1998, Vol. 36(3) págs. 216-27; Ghinea N, Milgrom E. A., "New function for the LH/CG receptor: transcytosis of hormone across the endothelial barrier in target organs" en *Semin. Reproduct. Med.*, 2001, Vol. 19(1), págs. 97-101). Entre las moléculas de PAMG-1, que experimentan modificaciones postraduccionales o establecen un enlace no covalente con otras moléculas, deben estar algunas cuya introducción en la secreción vaginal es mínima. La concentración de dichas moléculas en la secreción vaginal debe ser baja. La introducción baja o alta de diferentes moléculas se debe a la permeabilidad selectiva de las paredes capilares y a procesos secretorios selectivos. Como se sabe que la presencia de líquido amniótico en la secreción vaginal de mujeres en estado de gestación es indicativa de una rotura de membrana fetal, la detección de PAMG-1 en la secreción vaginal también puede usarse para detectar la presencia de una rotura de membrana fetal. Los ejemplos de métodos y dispositivos para detectar PAMG-1 en la secreción vaginal incluyen los métodos y dispositivos descritos en la presente memoria con más detalle. Los métodos que adicionalmente incluyen la etapa de detectar una rotura de la membrana fetal basándose en la detección de PAMG-1 en la muestra de secreción vaginal también se describen en la presente memoria con más detalle.

Como se ha analizado anteriormente, los métodos y dispositivos utilizados de acuerdo con la presente invención para detectar roturas de membranas fetales son muy específicos, sensibles y precisos. La sensibilidad y precisión se consiguen por medio de un amplio intervalo entre la concentración de fondo baja de PAMG-1 en la secreción vaginal de mujeres en estado de gestación y un umbral preestablecido más elevado de sensibilidad del dispositivo utilizado en la presente invención, siendo el umbral a su vez menor que la concentración típica de PAMG-1 en la secreción vaginal en el momento de una rotura de la membrana fetal, que crea una pérdida del líquido amniótico en la vagina. El establecimiento preciso del umbral a su vez se consigue usando al menos uno o más anticuerpos adicionales en la región de ensayo 14 contra PAMG-1 para establecer de manera precisa el umbral de sensibilidad predefinido del dispositivo usado en la presente invención (Ejemplo 9). Consecuentemente, los métodos y los dispositivos usados en la presente invención se diseñan para impedir la producción de resultados negativos falsos y positivos falsos mediante el uso de un par de anticuerpos monoclonales muy específicos M271 y M52 y al menos un anticuerpo adicional M42. Como resultado, la precisión de los métodos y dispositivos usados no se ve adversamente afectada por la presencia de infecciones vaginales u otras variables determinadas que han reducido la precisión de los métodos de la técnica anterior para detectar la rotura de membranas fetales. El dispositivo preferido usado y los métodos de la presente invención para detectar PAMG-1 en la secreción vaginal de mujeres en estado de gestación también se diseñan para ser fáciles, convenientes y rápidos de usar, haciendo posible por lo tanto el uso del dispositivo de la presente patente en una base ambulatoria. Por ejemplo, los métodos pueden incorporarse en un dispositivo fácil de usar que puede hacer funcionar un paciente con poca o ninguna experiencia previa con el dispositivo. Para usar el dispositivo no se requiere especial temporización, dilución o ajuste de las concentraciones de la muestra antes de realizar la medición. Esto hace que los métodos y dispositivos usados en la presente invención para detectar la rotura de las membranas fetales sean muy fiables y no muy susceptibles a errores del operador. Los resultados de los ensayos clínicos del dispositivo se presentan en el Ejemplo 10. En el Ejemplo 8 se presenta la medición de la concentración de PAMG-1 en la secreción vaginal con vaginitis. En el Ejemplo 8 puede observarse que la concentración máxima observada de PAMG-1 en un exudado inflamatorio está próxima a 3 ng/ml.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen con más detalle el aislamiento de PAMG-1 del líquido amniótico, la selección de un par de anticuerpos contra PAMG-1, el estudio de la especificidad de dichos anticuerpos y la concentración de PAMG-1 en un exudado inflamatorio de vaginitis.

Ejemplo 1: Concentración de PAMG-1 en Sangre y Líquido Amniótico

Se midió la concentración de PAMG-1 en el suero sanguíneo de mujeres en estado de gestación (37-40 semanas de gestación) y en el líquido amniótico (39-40 semanas de gestación) por ELISA, usando pares de anticuerpos monoclonales generados como se describe en Ejemplo 3.

5 Los anticuerpos M1, M271, M152 y M392, se adsorbieron a poliestireno en tampón carbonato-bicarbonato 0,05 M a pH 9,5 durante 18 horas a 6°C (100 µl de solución de anticuerpos en cada pocillo). La adsorción no específica al poliestireno se retiró con una solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,0, 200 µl en cada pocillo, se incubó durante una hora a 37°C.

10 Se añadieron cien µl de antígeno PAMG-1 a cada pocillo a concentraciones de 50, 25, 12, 6, 3, 15, y 0,7 ng/ml. Las muestras de suero sanguíneo o líquido amniótico se diluyeron en un tampón de BSA al 0,01% y Twin 20 al 0,05% en PBS. Las muestras diluidas se añadieron a los pocillos y los pocillos se incubaron durante una hora a 37°C. La reacción se desarrolló mediante la solución de ortofenilendiamina en tampón citrato-fosfato 0,05 M (pH 4,7), se incubó durante 20 minutos a 37°C. La densidad óptica se leyó a la longitud de onda de 492 nm.

15 Se buscó una concentración de anticuerpos en la primera capa y una concentración de conjugado que resultó en la curva de densidad óptica convencional para PAMG-1 con una pendiente máxima de aproximadamente 45 grados (un aumento por una unidad óptica corresponde a un aumento de la concentración de PAMG-1 en la muestra de 1 ng/ml), el límite superior (para la concentración de PAMG-1 50 ng/ml) de 1,5 unidades ópticas y un punto de concentración cero no superior a 0,1 unidades ópticas. Para la investigación, las muestras (suero, líquido amniótico, secreción vaginal y cervical) se congelaron a -40°C. Cada muestra se ensayó tres veces. El suero se diluyó a 1/5 de la concentración original. Las muestras de líquido amniótico se diluyeron a 1/2000 de la concentración original. Si la muestra tenía una densidad óptica superior a 1,5 unidades, la muestra se diluyó adicionalmente y se volvió a ensayar.

Los datos obtenidos se resumen a continuación en las Tablas 1-3.

25

Tabla 1

Concentración de PAMG-1 (ng/ml) en el suero sanguíneo de mujeres en estado de gestación

| N | M1-M91 | M271-M52 | M152-M91 | M392-M371 |
|----|--------|----------|----------|-----------|
| 1 | 20 | 0 | 15 | 12 |
| 2 | 20 | 0 | 15 | 13 |
| 3 | 60 | 5 | 50 | 46 |
| 4 | 50 | 7 | 48 | 50 |
| 5 | 40 | 4 | 30 | 34 |
| 6 | 64 | 15 | 50 | 56, |
| 7 | 20 | 7 | 15 | 14 |
| 8 | 48 | 8 | 35 | 30 |
| 9 | 15 | 0 | 10 | 14 |
| 10 | 40 | 5 | 20 | 35 |

Tabla 2

Concentración de PAMG-1 (ng/ml) en el suero sanguíneo de mujeres en estado de gestación (37-40 semanas de gestación)

30

| N | M1-M91 | M271-M52 | M152-M91 | M392-M371 |
|----|--------|----------|----------|-----------|
| 1 | 90 | 8 | 70 | 50 |
| 2 | 100 | 15 | 90 | 75 |
| 3 | 105 | 16 | 95 | 75 |
| 4 | 120 | 22 | 100 | 94 |
| 5 | 100 | 12 | 98 | 90 |
| 6 | 98 | 14 | 95 | 80 |
| 7 | 104 | 20 | 90 | 80 |
| 8 | 98 | 25 | 75 | 60 |
| 9 | 64 | 5 | 55 | 40 |
| 10 | 70 | 10 | 60 | 40 |

Tabla 3
Concentración de PAMG-1 (ng/ml) en el líquido amniótico (39-40 semanas de gestación)

| N | M1-M91 | M271-M52 | M152-M91 | M392-M371 |
|----|--------|----------|----------|-----------|
| 1 | 8.000 | 1.680 | 6.400 | 5.000 |
| 2 | 12.000 | 8.000 | 6.000 | 5.000 |
| 3 | 10.000 | 6.000 | 7.000 | 6.000 |
| 4 | 6.000 | 2.000 | 5.000 | 4.500 |
| 5 | 8.000 | 12.000 | 5.800 | 5.000 |
| 6 | 7.000 | 20.000 | 5.000 | 5.000 |
| 7 | 6.000 | 2.000 | 4.000 | 3.000 |
| 8 | 75.000 | 8.000 | 5.000 | 4.700 |
| 9 | 2.000 | 3.000 | 1.440 | 1.500 |
| 10 | 40.000 | 13.000 | 36.000 | 25.000 |

Ejemplo 2: Aislamiento de PAMG-1

- 5 D. Petrunin propuso el método modificado de aislamiento de PAMG-1 en 1980 (Petrunin, D. D., Kozlyayeva, G. A., Tatarinov, Yu. S., Shevchenko, O. P., Bulletin of Experimental Biology and Medicine, Nº 5, pág. 558, 1980 (en Ruso)). Las etapas del esquema se indican en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4
Etapas de Aislamiento de PAMG-1

| Etapas de aislamiento | Pureza % | Rendimiento % |
|--|----------|---------------|
| Líquido Amniótico 16-25 semanas de gestación | 4 | 100 |
| Precipitación por cloruro de lantano al 0,5% | 25 | 90 |
| Precipitación por sulfato de amonio al 50% de saturación | 35 | 70 |
| Precipitación por sulfato de litio al 60% de saturación | 60 | 60 |
| Separación por Cromatografía de fase inversa | 90 | 30 |

15 La PAMG-1 se separó del líquido amniótico a las 16 a 25 semanas de gestación. El líquido se obtuvo de mujeres en estado de gestación cuya gestación finalizó debido a consideraciones médicas. Se añadió al líquido amniótico una solución de cloruro de lantano al 10% a una proporción volumétrica de 20:1 (de manera que su concentración final era del 0,5%) y se mantuvo a 4°C durante 18 horas. Se formó un precipitado y se separó por centrifugación a 8.000 rpm durante 30 minutos. Se disolvió el precipitado en la solución saturada de Na₂HPO₄ y se separó el precipitado de las sales de lantano insolubles producidas en el proceso por centrifugación a 8.000 rpm durante 30 minutos. Se fraccionó la solución resultante con sulfato de amonio saturado al 50% incubando a 4°C durante 18 horas y el precipitado resultante se disolvió en agua destilada para restablecer en ambos casos el volumen de las fracciones de precipitación disueltas al volumen inicial del líquido amniótico. Después se precipitó la solución por sulfato de litio saturado al 60% y se disolvió el precipitado en una pequeña cantidad de agua destilada. Después de la diálisis, las mezclas de adsorbieron con pirofosfato de calcio añadiendo un volumen igual de humedad absorbente a la solución de proteína, entremezclando e incubando durante 10-15 minutos y se separó el absorbente por centrifugación.

25 Ejemplo 3: Producción de líneas híbridas

30 **Experimento de Hibridoma 1.** Se usaron linfocitos de ganglios linfáticos popliteales de 5 ratones BALB/c. Los ratones se inmunizaron con cinco inyecciones de PAMG-1 en las almohadillas de las patas. Cada inyección consistió en 100 µg de PAMG-1 y adyuvante completo de Freund en una proporción 1:1. Después de la fusión celular, las células se cultivaron en 1152 pocillos. Se ensayó un total de 363 hibridomas primarios, 38 de ellos eran positivos para PAMG-1. Después se ensayó la especificidad de los anticuerpos monoclonales estudiando su unión de reacción cruzada con las proteínas alfa-2-microglobulina de la fertilidad, gonadotropina coriónica humana, beta-1 glicoproteína trofoblástica, lactógeno de placenta humana, alfa-fetoproteína y albúmina de suero humana. Se seleccionaron cuarenta hibridomas primarios cuyos anticuerpos monoclonales no mostraron reacción cruzada con otras proteínas. Después se usó un método de diluciones limitante para clonar dos veces los hibridomas primarios específicos de PAMG-1. Finalmente, se seleccionaron cinco clones que aparentemente eran los más estables y productores productivos de anticuerpos monoclonales M1, M38, M42, M52, M91.

Experimento de Hibridoma 2. Se usaron linfocitos del bazo de 5 ratones. Los ratones se inmunizaron cinco veces por inyección intraperitoneal con 100 µg de PAMG-1. Cada inyección consistió en PAMG-1 y adyuvante completo de Freund en una proporción 1:1. Se usaron 1344 pocillos y se ensayaron 562 hibridomas. De éstos, 45 resultaron positivos para PAMG-1 y 19 no mostraron reacción cruzada con las otras proteínas, por ejemplo, específico para PAMG-1. Los hibridomas que no mostraron reacción cruzada se clonaron dos veces y se seleccionaron para el uso posterior 6 clones que mostraron ser más estables y productores intensivos de anticuerpos monoclonales M122, M152, M211, M271, M371 y M392.

Por lo tanto, se crearon 11 anticuerpos monoclonales para PAMG-1 y después se seleccionó el par de estos anticuerpos que detecta una concentración mínima de fondo de PAMG-1 en la secreción vaginal de mujeres en estado de gestación, como se ha descrito en el Ejemplo 4.

Líneas Celulares Específicas

Los anticuerpos M271 y M52 se producen a partir de las líneas celulares de hibridoma M271 y M52, respectivamente. Las líneas celulares que producen los anticuerpos monoclonales denominados en este documento M271 y M52, y adicionalmente M42, producen anticuerpos monoclonales usados para establecer y ajustar un umbral de sensibilidad del dispositivo como se ha describe a continuación.

La Tabla 5 indica los resultados para la producción de hibridomas de dos ensayos.

Tabla 5.

| | Total | Primer hibridoma | Segundo hibridoma |
|---|-------|------------------|-------------------|
| Total de pocillos | 2496 | 1152 | 1344 |
| Número de hibridomas primarios | 925 | 363 | 562 |
| Número de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales positivos para PAMG-1 | 83 | 38 | 45 |
| Número de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales específicos para PAMG-1 | 33 | 14 | 19 |
| Número de líneas de hibridoma estables que producen anticuerpos monoclonales, seleccionados para estudios posteriores | 11 | 5 | 6 |

Ejemplo 4: Selección del par de anticuerpos monoclonales que detectan una concentración mínima de PAMG-1 en la secreción vaginal de mujeres en estado de gestación.

Se adsorbió PAMG-1 a una concentración de 1 µg/ml en tampón carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,5, a placas de poliestireno incubando durante 18 horas a 4°C. Después se añadieron a los pocillos los anticuerpos indicados en la siguiente Tabla 6 en diluciones en serie comenzando a partir de 3 mg/ml. Las placas después se incubaron durante una hora a 37°C. Se añadió a los pocillos un conjugado de anticuerpos de conejo anti-IgG de anti-ratón marcados con peroxidasa de rábano picante. La reacción se desarrolló mediante la solución de ortofenilendiamina en tampón citrato-fosfato 0,05 M (pH 4,7), se incubó durante 20 minutos a 37°C. Se cuantificó el de anticuerpos monoclonales.

Tabla 6

Afinidad de unión de PAMG-1 a una concentración de 1 µg/ml por los anticuerpos monoclonales de la presente invención

| MAB | Valor a una concentración de PAMG-1 de 1 µg/ml |
|------|--|
| MI | 1:900.000 |
| M42 | 1:1.000.000 |
| M52 | 1:1.000.000 |
| M91 | 1:1.000.000 |
| M122 | 1:2.000.000 |
| M152 | 1:1.000.000 |
| M392 | 1:1.000.000 |

| | |
|------|-------------|
| M371 | 1:400.000 |
| M271 | 1:3.000.000 |
| M38 | 1:50.000 |
| M211 | 1:50.000 |

Las concentraciones de los anticuerpos monoclonales mostrados en la Tabla 1 son las concentraciones mínimas a las que los anticuerpos se unen a PAMG-1, siempre que la concentración de PAMG-1 en la solución sea 1 µg/ml. Cuanto más baja es la concentración, mayor es la capacidad del anticuerpo para detectar concentraciones mínimas de PAMG-1. Para desarrollar un ELISA de elevada sensibilidad para PAMG-1 se seleccionaron los anticuerpos monoclonales M271 y M52.

El anticuerpo monoclonal M271 no mostró reactividad cruzada en ELISA con las siguientes proteínas individuales del líquido amniótico: alfa-2-microglobulina de la fertilidad, gonadotropina coriónica humana, lactógeno de placenta humana; beta-1 glicoproteína trofoblástica, , alfa-fetoproteína y albúmina de suero humana.

Además de esto, en los experimentos con los anticuerpos M271 en columnas se fijaron en sefarsa y líquido amniótico no diluido pasó a través de la columna. Un eluado obtenido de las columnas después de la electroforesis ha mostrado una banda correspondiente a una masa molecular que coincide con la masa molecular de PAMG-1 (28-30 kDa). El anticuerpo monoclonal de elevada especificidad M271 se colocó en la almohadilla del dispositivo de tira de flujo lateral utilizado en la presente invención.

A diferencia del anticuerpo M271, el anticuerpo M52 mostró reactividad cruzada en ELISA con la proteína IGFBP-3 que es abundante en suero y en el líquido amniótico. La concentración de la IGFBP-3 no glicosilada medida en la secreción vaginal era aproximadamente de 600 ng/ml (Ejemplo 9). En los experimentos con el dispositivo de tira de la presente invención la IGFBP-3 a esta concentración no inhibe el reconocimiento de PAMG-1 tomando una concentración de 5 ng/ml.

Ejemplo 5: Ensayo ELISA de alta sensibilidad para la Alfa 1 Microglobulina Placentaria

La PAMG-1 no se pudo detectar en secreciones vaginales usando ELISA convencional y el par de anticuerpos M271-M52. Para permitir la detección, se aumentó la sensibilidad de ELISA disminuyendo la concentración de PAMG-1 necesaria para detectar 0,05 ng/ml.

Se desarrolló un sistema de inmunoensayo de tipo sándwich con los anticuerpos M271-M52, que demostraron sensibilidad a 50 picogramos por mililitro (0,05 ng/ml):

- 1ª capa: anticuerpos monoclonales M271, concentración de 6 µg/ml, en el tampón carbonato-bicarbonato, pH 9,5.
- 2ª capa: PAMG-1, concentraciones de 3200, 1600, 800, 400, 200, 100, 50 pg/ml, y secreciones cervicales y vaginales diluidas a concentración ½ en el tampón con pH = 7,0.
- 3ª capa: conjugado M52 en el tampón a una dilución 1/1000.

El aumento de la sensibilidad se obtuvo variando la primera y tercera capa. A diferencia del sistema de alta sensibilidad, en el sistema regular con sensibilidad de 1 ng/ml se formó la primera capa con concentración de M271 de 10 a 20 µg/ml y la dilución del conjugado (M52 marcado con peroxidasa de rábano picante) era 1/40.000.

Se obtuvo una curva de calibración convencional. Esta se muestra en la Tabla 7 a continuación, en la que la concentración PAMG-1 se proporciona en picogramos por mililitro (pg/ml) y la densidad óptica de la coloración E observada a una longitud de onda 450 nm es en unidades no dimensionales convencionales.

Tabla 7
Curva de Calibrado de ELISA de alta sensibilidad.

| | | | | | | | | |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| PAMG-1 pg/ml | 3200 | 1600 | 800 | 400 | 200 | 100 | 50 | 0 |
| E450nm | 2,000 | 1,725 | 1,432 | 1,130 | 0,851 | 0,600 | 0,304 | 0,051 |

Ejemplo 6: PAMG-1 en las secreciones vaginales de mujeres en estado de gestación

Tabla 8

Concentración de PAMG-1 (ng/ml) en la secreción vaginal de mujeres en estado de gestación.

Las mediciones se realizan usando diferentes pares de anticuerpos monoclonales contra PAMG-1 (29-41 semanas de gestación).

5

| N | Semanas de gestación | M1-M91 | M271-M52 | M152-M91 | M392-M371 |
|----|----------------------|-----------|----------|----------|-----------|
| 1 | 29 | 25 | 0.15 | 5 | 6 |
| 2 | 34 | 50 | 0.1 | 10 | 8 |
| 3 | 37-38 | 70 | 0.22 | 30 | 15 |
| 4 | 37-38 | 60 | 0.06 | 25 | 10 |
| 5 | 33-34 | 30 | 0.05 | 13 | 5 |
| 6 | 29-30 | 45 | 0.05 | 13 | 5 |
| 7 | 33 | 50 | 0.16 | 14 | 10 |
| 8 | 30 | 60 | 0.09 | 15 | 12 |
| 9 | 39-40 | 84 | 0.21 | 28 | 18 |
| 10 | 35-36 | 90 | 0.13 | 30 | 19 |
| 11 | 38-39 | 90 | 0.13 | 30 | 20 |
| 12 | 38 | 65 | 0.15 | 25 | 15 |
| 13 | 31 | 95 | 0.35 | 45 | 30 |
| 14 | 39 | 44 | 0.05 | 10 | 5 |
| 15 | 29-30 | 80 | 0.2 | 28 | 12 |
| 16 | 40-41 | 58 | 0.078 | 24 | 10 |
| 17 | 37 | 90 | 0.15 | 40 | 30 |
| 18 | 29-30 | 70 | 0.4 | 15 | 12 |
| 19 | 29 | 65 | 0.64 | 15 | 12 |
| 20 | 30 | 80 | 0.1 | 22 | 20 |

Después de la medición de las concentraciones mínimas, cada anticuerpo se marcó con peroxidasa de rábano picante. En el ensayo de ELISA, en los pocillos de las placas, se introdujeron anticuerpos no marcados a una concentración de 10 µg/ml. Después, se introdujo PAMG-1 a concentraciones de 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 pg/ml para una segunda capa en el plástico. A final, en cada pocillo de la placa se introdujo el conjugado de uno de los otros anticuerpos. Se seleccionaron los siguientes anticuerpos que funcionan emparejados (en este documento se muestra como anticuerpo-conjugado): M1-M91; M271-M52, M152-M91; M392-M371.

Para medir la concentración de PAMG-1 en la secreción vaginal de mujeres en estado de gestación se usaron estos pares de anticuerpos. Finalmente, se tomó el par de anticuerpos M271-M52, para el cual la concentración medida de PAMG-1 en la secreción vaginal era la más baja. La concentración de PAMG-1 para el par M271-M52 se midió usando ELISA de elevada sensibilidad. El par seleccionado M271-M52 y algunos otros pares se usaron para medir la concentración de PAMG-1 en el líquido amniótico y en el suero sanguíneo de mujeres no gestantes y gestantes. (Ejemplo 1, anterior).

Ejemplo 7: PAMG-1 en las secreciones vaginales y cervicales de mujeres en estado de gestación.

Tabla 9

Concentración de PAMG-1, picogramo por mililitro (pg/ml), en la secreción cervical y vaginal de mujer en estado de gestación. La gestación normal en la siguiente Tabla indica la ausencia de cualquier desviación diagnosticada del curso normal de la gestación.

5 La concentración de PAMG-1 se midió por Elisa de alta sensibilidad usando el par de anticuerpos M271-M52.

| Nº | PAMG-1, pg/ml en secreción cervical | PAMG-1 pg/ml en secreción vaginal | Semana de Gestación | Observaciones |
|----|-------------------------------------|-----------------------------------|---------------------|--|
| 1 | 230 | 150 | 29 | Gestación normal |
| 2 | 220 | 100 | 34 | Gestación normal |
| 3 | 340 | 150 | 38 | Erosión, sangre en secreción cervical |
| 4 | 110 | 220 | 37-38 | Gestación normal |
| 5 | 100 | 60 | 37-38 | Gestación normal |
| 6 | 350 | 78 | 40-41 | Sangre en secreción cervical |
| 7 | 60 | 400 | 29-30 | Amenaza de aborto |
| 8 | 50 | 50 | 33-34 | Gestación normal |
| 9 | 180 | 50 | 29-30 | Gestación normal |
| 10 | 470 | 150 | 37 | Sangre en secreción cervical |
| 11 | 600 | 640 | 29 | Amenaza de aborto |
| 12 | 150 | 160 | 33 | Gestación normal |
| 13 | 170 | 90 | 30 | Gestación normal |
| 14 | 122 | 210 | 39-40 | Oligohidramnios, gestosis |
| 15 | 300 | 50 | 39 | Gestosis, vaginitis |
| 16 | 56 | 130 | 35-36 | Trastorno de suministro sanguíneo retroplacentario |
| 17 | 120 | 130 | 38-39 | Anemia |
| 18 | 1000 | 5000 | 30-31 | Pérdida de líquido amniótico |
| 19 | 400 | 200 | 29-30 | Amenaza de aborto |
| 20 | 800 | 350 | 31 | Gestosis |

Ejemplo 8: PAMG-1 en las secreciones vaginales de mujeres en estado de gestación con Vaginitis

10

Tabla 10

Concentración de alfa-1-microglobulina placentaria en la secreción vaginal de mujer en estado de gestación con vaginitis. Las mediciones se realizaron usando una ELISA de sensibilidad no elevada

| Nº de Paciente | PAMG-1 (ng/ml) |
|----------------|----------------|
| 1 | 1,2 |
| 2 | 2,0 |
| 3 | 0 |
| 4 | 2,5 |
| 5 | 1,5 |
| 6 | 1,9 |
| 7 | 1,5 |
| 8 | 2,0 |
| 9 | 1,4 |
| 10 | 1,2 |

ES 2 401 036 T3

| | |
|----|-----|
| 11 | 1,0 |
| 12 | 0 |
| 13 | 0 |
| 14 | 3,0 |
| 15 | 1,5 |

Tabla 11
Concentración de alfa-1-microglobulina placentaria en la secreción vaginal de mujer en estado de gestación con vaginitis.

| N | Nombre (Segunda inicial, Primera inicial, inicial del Medio) | Diagnóstico | Resultados del Dispositivo de la presente invención (“-“ es “negativo”) | ELISA ng/ml |
|----|--|--|---|-------------|
| 1 | Ch., G. A. | 40 semanas de gestación. Vaginitis. | - | 1,2 |
| 2 | To., E. N. | 38 semanas de gestación. Hipotrofia fetal. Vaginitis. | - | 2,0 |
| 3 | Ne.,N.N. | 33 semanas de gestación. Pielonefritis. Vaginitis. | - | 0 |
| 4 | St., A. G. | 38 semanas de gestación. Pelvis contraída. Vaginitis. | - | 2,5 |
| 5 | So., T.N | 40 semanas de gestación. Vaginitis. | - | 1,5 |
| 6 | Ch., O. G. | 29-30 semanas de gestación. Riesgo de parto prematuro. Vaginitis. | - | 1,9 |
| 7 | Ry., V. V. | 29 semanas de gestación. Signos de parto. Vaginitis. | - | 1,5 |
| 8 | Ma., K. S. | 38 semanas de gestación. Erosión cervical. Vaginitis. | - | 2,0 |
| 9 | St., L. E. | 38-39 semanas de gestación. Pelvis contraída. Erosión cervical. Vaginitis. | | 1,4 |
| 10 | La., V. S. | 36-37 semanas de gestación. Riesgo de parto prematuro. Vaginitis. | - | 1,2 |
| 11 | Si., M. A. | 39 semanas de gestación. Nefropatía. Anemia. Vaginitis. | - | 1,0 |
| 12 | Sh., S. V. | 37-38 semanas de gestación. Nefropatía. Vaginitis. | - | 0 |
| 13 | Ab., R. V. | 36-37 semanas de gestación. Riesgo de parto prematuro. Vaginitis. | - | 0 |
| 14 | Gu., E. K. | 36 semanas de gestación. Riesgo de parto prematuro. Vaginitis. | - | 3,0 |
| 15 | Ro., N. V. | 35 semanas de gestación. Vaginitis. | - | 1,5 |
| 16 | De., S. V. | 32 semanas de gestación. Erosión cervical. Vaginitis. | - | 0 |
| 17 | Zd., I. V. | 35 semanas de gestación. Riesgo de parto prematuro. Erosión Cervical. Vaginitis. | | 1,0 |
| 18 | Ko., T. V. | 24 semanas de gestación. Riesgo de parto prematuro. Vaginitis. | - | 0 |

| | | | | |
|----|------------|--|---|---|
| 19 | Ma., I. V. | 36 semanas de gestación. Riesgo de parto prematuro. Vaginitis. | - | 0 |
| 20 | Io., I. V. | 40 semanas de gestación. Erosión cervical. Vaginitis. | - | 0 |
| 21 | Ma., S. | 39 semanas de gestación. | - | 0 |
| 22 | Ve., E. L. | 38 semanas de gestación. Erosión Cervical. Vaginitis. | - | 0 |
| 23 | St., I. N. | 36 semanas de gestación. Nefropatía. Vaginitis. | - | 0 |
| 24 | Ro., V. A. | 39-40 semanas de gestación. Anemia. Vaginitis. | - | 0 |
| 25 | Pu., T. A. | 38-39 semanas de gestación. | - | 0 |
| 26 | Tu., Y. A. | 21 semanas de gestación. Sospecha de PROM. | - | 0 |
| 27 | No., G. V. | 22 semanas de gestación. Riesgo de terminación. | - | 0 |
| 28 | Ma., E. V. | 31-32 semanas de gestación. Pielonefritis. Vaginitis. | - | 0 |
| 29 | St., IV. | 36 semanas de gestación. Riesgo de terminación | | 0 |
| 30 | Ka., K. P. | 32 semanas de gestación. Nefropatía. | - | 0 |

Ejemplo 9: Modificaciones de las características del dispositivo de tira

5 En el primer experimento, se prepararon soluciones de Mab M52 a concentraciones de 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 y 1/32 mg/ml. Cada solución se colocó en un dispositivo de tira. Una mezcla de los tres MAb (M52, M271, M42) también se diluyó a las concentraciones 1,1/2, 1/4, 1/8, 1/16 y 1/32 del original y cada solución diluida se introdujo en un dispositivo de tira individual. Después, se añadió PAMG-1 conteniendo la solución a una concentración de 50 ng/ml a cada uno de los dispositivos de las 12 tiras. La solución de anticuerpo puro M52 hizo visible la banda coloreada en la región de ensayo a la concentración de 1/8 y en la mezcla de MAb la banda coloreada se hizo visible a una concentración de 1/2. Por lo tanto, la mezcla de MAb inhibe la unión de moléculas PAMG-1, ajustando así la visibilidad de la banda.

15 Se colocaron anticuerpos monoclonales a concentraciones: M52: 0,8 mg/ml, M271:0,1 mg/ml y M42: 0,1 mg/ml en la región de ensayo de la mayoría de los dispositivos de tira. Después, se añadió PAMG-1 en uno de un amplio intervalo de concentraciones, de 12800 ng/ml a 7 ng/ml y a 1 ng/ml a la región de ensayo de cada uno de los dispositivos de tira de la presente invención. La banda de ensayo podía observarse a simple vista en el intervalo de concentraciones de PAMG-1 de 12800 ng/ml a 7 ng/ml y no podía observarse a la concentración de 1 ng/ml. Al mismo tiempo, cuando se usó solución M52 pura en la misma concentración, la tira de ensayo podía observarse en todo el intervalo de concentraciones de PAMG-1, incluyendo 1 ng/ml, aunque la intensidad a 1 ng/ml era baja. Esto aumentó fuertemente la probabilidad de resultados positivos falsos en pacientes con determinadas patologías tales como inflamación.

25 1. Ajuste de la sensibilidad del dispositivo de tira utilizado en la presente invención con una combinación de dos anticuerpos en la región de ensayo.

30 En la primera investigación, se introdujeron únicamente los anticuerpos M52 (a una concentración de 0,4 mg/ml) en la región de ensayo. En la segunda investigación, se introdujeron los anticuerpos M52 (a una concentración de 0,4 mg/ml) y los anticuerpos M271 (a una concentración de 0,4 mg/ml) en la región de ensayo. El anticuerpo M271 conjugado con partículas de oro se introdujo en la región de la almohadilla a una concentración seleccionada de manera que la densidad óptica fuera diez en la longitud de onda de 510 nm. Este conjugado se introdujo en la almohadilla a una solución de sacarosa al 10% y caseína al 2%. Se realizó la titulación de PAMG-1 a concentraciones de 20, 10, 5 y 1 ng/ml.

35 En las tablas siguientes, los números son índices de densidad óptica relativos medidos por el programa Sigma Scan en un escáner. Los anticuerpos M271 están en la almohadilla; una combinación M271+M52 están en la región del

ES 2 401 036 T3

ensayo. "+" indica que la tira de ensayo es visible (lo suficientemente coloreada para detectar a simple vista), "-" indica que la banda de ensayo no puede detectarse a simple vista.

| Concentración de PAMG-1, ng/ml | 20 | 10 | 5 | 1 |
|--------------------------------|---------|---------|---------|--------|
| MAB M52 Visible | 62 + | 58 + | 39 + | 2 - |
| MAB M52+M271 Visible | 82 + | 8 - | 2 - | 4 - |

- 5 La sensibilidad de ensayo cambio de 5 ng/ml en la primera investigación a 20 ng/ml en la segunda investigación. Se puede concluir que añadiendo el MAB M271 a la región de ensayo, se obtiene cuatro veces la inhibición de la sensibilidad.

10 2. Ajuste de la intensidad de color de una banda de ensayo en el dispositivo de tira con una combinación de dos anticuerpos

15 En la primera investigación, solamente se introdujeron los anticuerpos M52 (a una concentración de 0,8 mg/ml) en la región de ensayo. En la segunda investigación, los anticuerpos, M52 (0,8 mg/ml), los anticuerpos M271 (0,7 mg/ml) y los anticuerpos M42 (0,8 mg/ml) se introdujeron en la región de ensayo. La mezcla de anticuerpos para la región de ensayo se preparó como se indica a continuación: 14 µl (microlitros) de solución de anticuerpo M52, a una concentración de 8,6 mg/ml, se mezcló con 7 µl de una solución de M42, a una concentración de 13,9 mg/ml y con 3 µl de solución de M271 a una concentración de 10,9 mg/ml. Después el tampón se añadió al volumen total de 150 µl y la solución se introdujo en el dispositivo de tira.

- 20 En la siguiente tabla, se muestran las densidades ópticas relativas.

| Concentración de PAMG-1, ng/ml | 50 | 25 | 12 | 6 | 3 | 1,5 |
|--------------------------------|---------|---------|---------|--------|--------|--------|
| MAB M52 Visible | 17 + | 13 + | 9 + | 5 + | 2 - | 0 - |
| MAB M271+M52+M42 Visible | 25 + | 18 + | 13 + | 3 - | 0 - | 0 - |

25 La pendiente (gradiente) de la curva de densidad óptica difiere entre la primera y segunda investigación. A una concentración de PAMG-1 de 12 ng/ml, la línea coloreada en la tira en la segunda investigación era más brillante que en la primera investigación. A una concentración de PAMG-1 de 6 ng/ml, la línea coloreada en la tira era visible en la primera investigación pero invisible en la segunda investigación.

30 Con una combinación de anticuerpos se observan bandas visualmente más brillantes. Por lo tanto, a pesar de tener casi la misma sensibilidad, la intensidad de coloración observada a simple vista era diferente.

35 3. El ajuste de sensibilidad y pendiente de la curva de intensidad de coloración del dispositivo de la presente invención usando una combinación de cuatro anticuerpos.

En la siguiente tabla "+" indica banda de ensayo visible, "-" la banda de ensayo que no puede detectarse a simple vista.

| Concentración de PAMG-1, ng/ml | 0 | 1 | 2,5 | 5 | 10 | 25 | 50 |
|--------------------------------|---|---|-----|---|----|----|----|
| MAB M52+M42+M172 | - | - | - | - | + | + | + |
| MAB M271+M52+M42+M122 | - | - | - | + | + | + | + |

Por lo tanto, combinando anticuerpos se puede ajustar la sensibilidad del ensayo.

Ejemplo 10: Resultados de Ensayos Clínicos

PROTOCOLO DEL ESTUDIO

- 5 Se evaluaron pacientes por "evaluación clínica" - control y mediante el dispositivo usado en la presente invención.
Criterios de inclusión:
 1) Edad gestacional 20,0-41,0 semanas.
 2) Paciente indicando señales o síntomas de provocación de PROM o PPROM.
 10 3) Sin exámenes vaginales digitales hasta que las muestras se obtuvieron para evaluar al paciente de PROM o PPROM.
 4) La paciente permite un examen especular estéril con objeto de recoger evaluaciones clínicas convencionales (agrupación, nitrazina, helecho) y frotis estériles para el ensayo PAMG-1.
Criterios de exclusión
 1) Sangrado vaginal activo de cualquier fuente
 15 2) Placenta previa.

Análisis estadísticos disponibles de 192 pacientes el 15/12/2000 del Sharp Memorial Mary Birch Hospital para Mujeres (San Diego) y del Summit Medical Center (Oakland).

- 20 En dos pacientes de 192, el dispositivo utilizado en la presente invención dio una respuesta positiva cuando la valoración clínica convencional no mostró ninguna señal de PROM. Estos dos casos, por lo tanto, se contaron originalmente como resultado positivo falso del dispositivo usado en la presente invención (véase datos "No Corregidos" más abajo). Sin embargo, los síntomas de PROM se desarrollaron rápidamente en ambas pacientes en horas después del ensayo. El diagnóstico de PROM se confirmó en una segunda valoración clínica y los dos
 25 resultados del dispositivo usado en la presente invención se consideraron positivos verdaderos (la columna "Corregido" a continuación representa los datos del ensayo final).

**Datos combinados
(No corregidos)
Dx PROM**

a = 84, b = 5, c = 2, d = 101
 Sensibilidad = $a/(a+c) = 84/(84+2) = 97,7\%$
 Especificidad = $d/(b+d) = 101/(5+101) = 95,3\%$
 PPV = $a/(a+b) = 84/(84+5) = 94,4\%$
 NPV = $d/(d+c) = 101/(101+2) = 98,1\%$

en la que

- 30 a es el número de casos positivos verdaderos observados;
 b es el número de casos negativos falsos observados;
 c es el número de casos positivos falsos observados;
 d es el número de casos negativos verdaderos observados;

$$\text{Sensibilidad} = \frac{a}{a+c}; \quad \text{Especificidad} = \frac{d}{b+d};$$

Valor positivo predicho:

$$PPV = \frac{a}{a+b}$$

- 35 Valor negativo predicho:

$$NPV = \frac{d}{d+c}$$

Positivo verdadero es el número respuestas positivas por el dispositivo usado en la presente invención, PROM se confirma por la evaluación clínica posterior,

- 40 Negativo positivo es el número de respuestas negativas confirmadas por la evaluación clínica posterior,

Positivo falso es el número de respuestas positivas, pero PROM no se confirma por la evaluación clínica posterior,

Negativo falso es el número de respuestas negativas, pero PROM se confirma por la evaluación clínica posterior.

ES 2 401 036 T3

Tabla 12. Ensayos del dispositivo usado en la presente invención (Lot C 98-0007) en el Third Maternity Hospital de Moscú, Federación Rusia, Obstetrics and Gynecology Departamento N° 2.

| Nº | Nombre (Segunda inicial, Primera inicial, Inicial del medio) | Diagnóstico | Resultados Amnisure | Observaciones |
|----|--|---|------------------------|---|
| 1 | Ser., L.B. | 17 semanas de gestación. Amenaza de aborto. Vaginitis. | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 2 | Ga., L. A. | 17 semanas de gestación. Amenaza de aborto | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 3 | Kuz., M. B. | 23 semanas de gestación. pH- Negativo. Sangre. | Negativo | Sin pérdida |
| 4 | Bui., M. V. | 39 semanas de gestación. Sospecha de pérdida. Vaginitis | Positivo | Observación clínica: descarga vaginal aumentada. Observación adicional: ensayo positivo confirmado (más descarga, inicio del parto). |
| 5 | Kra., E. U. | 40 semanas de gestación. Gestosis. Amniotomía | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 6 | Mel., N. V. | 39 semanas de gestación. Gestosis. Enfermedad urolítica | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 7 | Buh., S. N. | 29 semanas de gestación. Hipertensión | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 8 | Niv., I. P. | 27-28 semanas de gestación. Amenaza de aborto | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 9 | Aik.,A. | 35 semanas de gestación. Amenaza de aborto. Vaginitis | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 10 | Yak., L. A. | 40 semanas de gestación. | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 11 | Kis., G. V. | 33 semanas de gestación. Amenaza de aborto. Vaginitis | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 12 | Koch., L. A. | 34 semanas de gestación. Sospecha de pérdida | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 13 | Bai., S. A. | 32 semanas de gestación. Amenaza de aborto. Gestosis | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 14 | Mor. I. S. | 32 semanas de gestación. Amenaza de aborto. Vaginitis | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 15 | Ugr.,T.I. | 32-33 semanas de gestación. Gestosis. Líquido amniótico bajo | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |

ES 2 401 036 T3

| | | | | |
|----|-------------|--|----------|----------------------------------|
| 16 | Pav., N. A. | 22-23 semanas de gestación. Gestosis. Vaginitis | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 17 | Bog., T.I. | 29 semanas de gestación. Amenaza de aborto | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 18 | Var., T. I. | 32 semanas de gestación. Gestosis | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 19 | Dal., O. V. | 35 semanas de gestación. Gestosis. Vaginitis | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 20 | Koz., O. A. | 40 semanas de gestación. | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 21 | Sen., S. G. | 12-13 semanas de gestación. Amenaza de aborto | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 22 | Pol., E. A. | 21 semanas de gestación. Amenaza de aborto | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 23 | Ber., L. M. | 24 semanas de gestación. Amenaza de aborto | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 24 | Ard., V. M. | 39 semanas de gestación. Gestosis aguda. Insuficiencia placentaria | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 25 | Aki.,A. | 8 semanas de gestación. Gestosis. Vaginitis | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |

Tabla 13. Ensayos del dispositivo usado en la presente invención (Lot C 98-0007) en el Third Maternity Hospital de Moscú Federación de Rusia.

| Nº | Nombre | Diagnostico | Resultados Amnisure | Observaciones |
|----|-------------|---|---------------------|---|
| 1 | Fan., E.A. | 38 semanas de gestación. Edema | Negativo | La observación clínica confirmó los resultados del ensayo |
| 2 | Sem., Z. D. | 36 semanas de gestación. Gestosis | Negativo | La observación clínica confirmó los resultados del ensayo |
| 3 | Tab.,N.V. | 36-37 semanas de gestación. Amenaza de aborto | Negativo | La observación clínica confirmó los resultados del ensayo |
| 4 | Zah., O. P. | 35 semanas de gestación. Edema. Vaginitis | Negativo | La observación clínica confirmó los resultados del ensayo |
| 5 | Dem., O. V. | 38-39 semanas de gestación. Edema | Negativo | La observación clínica confirmó los resultados del ensayo |
| 6 | Vul., D. V. | 32 semanas de gestación. Amenaza de aborto. Vaginitis | Negativo | La observación clínica confirmó los resultados del ensayo |
| 7 | Klo., V. V. | 38-39 semanas de gestación. Edema. Pielonefritis. Erosión Cervical | Negativo | La observación clínica confirmó los resultados del ensayo |
| 8 | Bor., E. A. | 35-36 semanas de gestación. Alteración de la circulación de la placenta | Negativo | La observación clínica confirmó los resultados del ensayo |
| 9 | Jer., E. A. | 40-41 semanas de gestación. | Negativo | La observación clínica confirmó los resultados del ensayo |

ES 2 401 036 T3

| | | | | |
|----|-------------|---|----------|---|
| 10 | Vik., N. P. | 41-42 semanas de gestación. Pielonefritis. Edema. Vaginitis | Negativo | La observación clínica confirmó los resultados del ensayo |
| 11 | Tul., O. S. | 35-36 semanas de gestación. Gestosis. Obesidad. | Negativo | La observación clínica confirmó los resultados del ensayo |
| 12 | Med., T. E. | 38-39 semanas de gestación. Varicosis | Negativo | La observación clínica confirmó los resultados del ensayo |
| 13 | Kuz., T. A. | 39-40 semanas de gestación. | Negativo | La observación clínica confirmó los resultados del ensayo |
| 14 | Kab., E. M. | 39-40 semanas de gestación. Edema. Polihidramnios | Negativo | La observación clínica confirmó los resultados del ensayo |
| 15 | Che., E. V. | 39-40 semanas de gestación. Edema. Anemia | Negativo | La observación clínica confirmó los resultados del ensayo |
| 16 | Tih., T. Y. | 40 semanas de gestación. Preeclampsia | Negativo | La observación clínica confirmó los resultados del ensayo |
| 17 | Bah., N. I. | 39-40 semanas de gestación. Pronóstico de liberación. Sospecha de pérdida | Negativo | La observación clínica confirmó los resultados del ensayo |
| 18 | Gol., N. V. | 38-39 semanas de gestación. Hipoxia fetal | Negativo | La observación clínica confirmó los resultados del ensayo |
| 19 | Gri., O. V. | 25 semanas de gestación. Amenaza de aborto. | Negativo | La observación clínica confirmó los resultados del ensayo |

Tabla 14. Ensayos de dispositivo usado en la presente invención (Lot C 98-0007) en el Third Maternity Hospital de Moscú Federación Rusa.

| Nº | Diagnóstico | Resultados Amnisure | Observaciones |
|----|---|---------------------|---|
| 1 | 40 semanas de gestación. Feto gigante. Sospecha de pérdida. | Positivo | Dolores de parto, actividad de parto desarrollada en 4 horas. Se observa pérdida evidente |
| 2 | 34 semanas de gestación. Amenaza de aborto | Negativo | Observación clínica durante 6 horas: sin pérdida |
| 3 | 39 semanas de gestación. | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 4 | 40 semanas de gestación. | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 5 | 39-40 semanas de gestación. | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 6 | 39-40 semanas de gestación. | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 7 | 39-40 semanas de gestación. Erosión Cervical | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 8 | 40 semanas de gestación. Síntomas de parto. Pérdida de líquido amniótico. | Positivo | Observación clínica: pérdida de líquido amniótico |
| 9, | 39 semanas de gestación. | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 10 | 39-40 semanas de gestación. | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 11 | 39 semanas de gestación. | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |

Tabla 15. Ensayos del dispositivo usado en la presente invención (Lot C 98-0007) en el Third Maternity Hospital de Moscú, Federación de Rusia, Obstetrics and Gynecology Chair of the State Moscow University de Rusia.

| N | Diagnosis | Resultados Amnisure | Observaciones |
|----|--|---------------------|---|
| T | 39 semanas de gestación. Nefropatía. Hidramnión | Negativo | Dolores de parto, actividad de parto desarrollada en 4 horas. Se observa pérdida evidente |
| 2 | 41 semanas de gestación. Edema | Negativo | Observación clínica durante 6 horas: sin pérdida |
| 3 | 39-40 semanas de gestación. Feto gigante. Síntomas de parto. Nefropatía | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 4 | 39-40 semanas de gestación. | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 5 | 37-38 semanas de gestación. Mezcla sangre. Hipertensión | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 6 | 36 semanas de gestación. Nefropatía | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 7 | 40 semanas de gestación. Sospecha de pérdida | Positivo | Observación clínica: pérdida. Desarrollo de parto en 30 min. |
| 8 | 39-40 semanas de gestación. | Negativo | Observación clínica: sin pérdida de líquido amniótico |
| 9 | 38-39 semanas de gestación. | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 10 | 38 semanas de gestación. | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 11 | 39 semanas de gestación. Parturienta adolescente. | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 12 | 32 semanas de gestación. Hipotrofia fetal | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 13 | 39-40 semanas de gestación. Gestosis | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 14 | 24 semanas de gestación. Amenaza de aborto | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 15 | 34-35 semanas de gestación. Gestosis | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 16 | 33 semanas de gestación. Edema | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 17 | 34-35 semanas de gestación. Gestosis. | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 18 | 35-36 semanas de gestación. Hipotrofia fetal | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 19 | 32 semanas de gestación. Amenaza de aborto | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 20 | 38-39 semanas de gestación. Sospecha de pérdida. Mezcla de sangre en descarga vaginal. | Negativo | Observación clínica: sin pérdida. Rotura de aguas en 10 horas, inicio de parto. |
| 21 | 40-41 semanas de gestación. Síntomas de parto | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 22 | 25 semanas de gestación. Amenaza de aborto | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |
| 23 | 28 semanas de gestación. Gestosis | Negativo | Observación clínica: sin pérdida |

Observaciones: La pérdida de líquido amniótico en las Tablas 13, 14, 15 se ensayó clínicamente por la cantidad descarga vaginal y por examen ultrasonográfico.

5 La observación clínica ampliada a resultados de ensayos negativos fue posible porque se hospitalizó a las pacientes para el tratamiento de enfermedades concomitantes.

Además debe entenderse que todos los valores son aproximados y se proporcionan para la descripción.

10 Tabla 16. Microorganismos depositados en la Institución Depositaria de la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM) (1 Dorozhny proezd 1, Moscú 117545, Rusia).

| Nombre | Fecha del depósito | Nº de Acceso |
|------------------------------------|---------------------------|---------------------|
| Célula de hibridoma Líneas N52 | 22 de mayo de 2003 | VKPM H-92 |
| Célula de hibridoma Líneas N271 | 22 de mayo de 2003 | VKPM H-93 |
| Célula de hibridoma Líneas N42 | 22 de mayo de 2003 | VKPMH-94 |

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para detectar la pérdida de líquido amniótico en secreciones vaginales, comprendiendo el método detectar la unión de un par de anticuerpos específicos para la alfa-1 microglobulina placentaria (PAMG-1) en una secreción vaginal.
2. El método de la reivindicación 1, en el que
- 10 el par de anticuerpos es sensible a un nivel de PAMG-1 por encima de un ruido de fondo; y/o donde uno del par de anticuerpos se inmoviliza en un soporte sólido.
3. El método de la reivindicación 2, en el que
- 15 el soporte sólido es una membrana a través de la cual puede pasar el líquido por acción capilar; y/o los anticuerpos son anticuerpos monoclonales; y/o comprende adicionalmente un segundo anticuerpo específico para PAMG-1 inmovilizado en el soporte sólido.
4. El método de la reivindicación 3, en el que la proporción de anticuerpos inmovilizados en el soporte sólido proporciona un nivel umbral de detección de PAMG-1 de 5 nanogramos por mililitro.
- 20 5. El método de la reivindicación 3, en el que un anticuerpo monoclonal se selecciona del grupo que consiste en M271, producido por el hibridoma N271, depositado en la Institución Depositaria de la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM) y con número de acceso asignado VKPM-93; M52, producido por el hibridoma N52, depositado en la VKPM y con número de acceso asignado VKPM-92; y M42, producido por el hibridoma N42, depositado en la VKPM y con el número de acceso asignado VKPM-94.
- 25 6. El método de la reivindicación 1, comprendiendo el método:
- (i) seleccionar un par de anticuerpos monoclonales altamente específicos para la determinación de la concentración mínima de ruido de fondo de PAMG-1 en una secreción vaginal; y
- 30 (ii) seleccionar otros anticuerpos monoclonales anti-PAMG-1 para ser usados en combinación con el par en un dispositivo de ensayo en tira con el fin de determinar de manera precisa un umbral prescrito de sensibilidad del dispositivo de ensayo en tira.
- 35 7. El método de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo monoclonal altamente específico del par de anticuerpos monoclonales (i) se localiza en una región almohadilla del dispositivo en tira; y/o en donde el anticuerpo monoclonal altamente específico se une a un marcador.
- 40 8. El método de la reivindicación 7, en donde el marcador es una partícula de colorante.
9. El método de la reivindicación 6, en el que
- 45 el segundo anticuerpo monoclonal del par (i) se localiza en una región de prueba del dispositivo en tira; y/o en el que uno o más de los otros anticuerpos monoclonales anti-PAMG-1 adicionales (ii) se localizan en una región de ensayo de dicho dispositivo en tira en una proporción predefinida respecto al segundo anticuerpo (i) del par.
10. El método de la reivindicación 9, en el que dichos anticuerpos (ii) usados en combinación con dicho par se utilizan para establecer un umbral predefinido de sensibilidad en dicho dispositivo en tira.
- 50 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6, 9, y 10, en el que dichos anticuerpos monoclonales anti-PAMG-1 (i) y (ii) se usan en combinación en una proporción predefinida para establecer el intervalo óptimo entre el valor del nivel de fondo de dicho PAMG-1 en la secreción vaginal, en el rango de 0.05 a 0.2 nanogramos por mililitro, y el umbral de sensibilidad de dicho dispositivo en tira, dicho umbral estando en el rango de 5 a 10 nanogramos por mililitro, con el fin de minimizar la probabilidad de resultados falsos positivos y falsos negativos en la detección de cantidades pequeñas de líquido amniótico en la secreción vaginal de mujeres embarazadas.
- 55 12. Uso de un dispositivo que comprende un anticuerpo inmovilizado específico para PAMG-1 y un anticuerpo móvil específico para PAMG-1 para detectar la pérdida de líquido amniótico en secreciones vaginales, en el que la movilización del anticuerpo móvil por una muestra de líquido permite la unión del anticuerpo móvil a cualquier PAMG-1 de la muestra y la unión del complejo PAMG-1-anticuerpo móvil formado de esta manera, al anticuerpo inmovilizado, en donde el anticuerpo móvil comprende un marcador.
- 60 13. El uso de la reivindicación 12, en el que
- 65 los anticuerpos son anticuerpos monoclonales, y/o el anticuerpo inmovilizado se inmoviliza en un soporte membrana; y/o

el marcador es oro coloidal; y/o
además comprende un segundo anticuerpo específico para PAMG-1 inmovilizado en el soporte sólido; y/o
la proporción de los anticuerpos inmovilizados en el soporte sólido proporciona un nivel umbral de detección de
pAMG-1 de 5 nanogramos por mililitro.

- 5
14. El uso de la reivindicación 12, en el que el anticuerpo monoclonal se selecciona del grupo que consiste en M271, producido por el hibridoma N271, depositado en la Institución Depositaria de la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM) y con el número de acceso asignado VKPM-93; M52, producido por el hibridoma N52, depositado en el VKPM y con el número de acceso asignado VKPM-92; y M42, producido por el
- 10 hibridoma N42, depositado en el VKPM y con el número de acceso asignado VKPM-94.

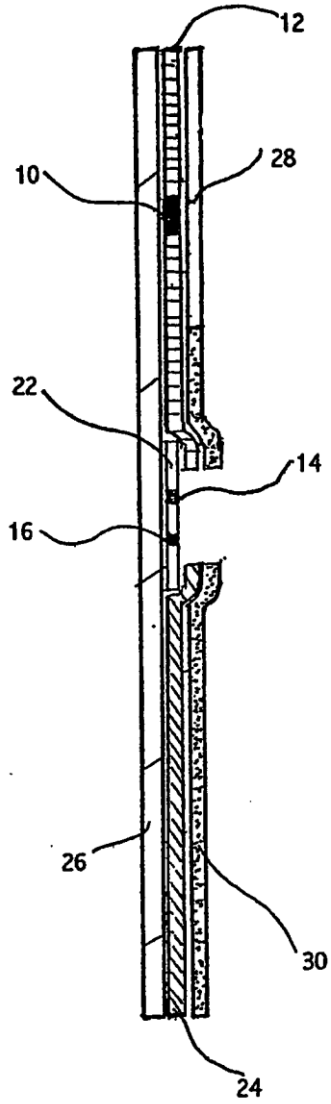


Fig. 1

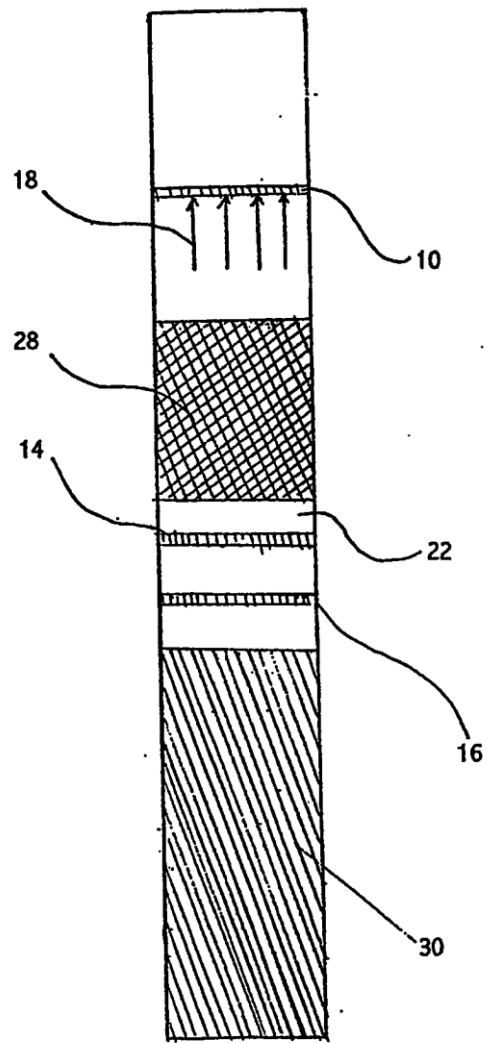


Fig. 2

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 5554504 A [0006]
- US 5968758 A [0017] [0049]
- US 5597700 A [0017]
- US 5891722 A [0017] [0051]
- US 5877029 A [0017]
- SU 1614184 A1 [0021] [0027]
- WO 8912690 A [0055]
- US 5476786 A [0056]
- US 5132405 A, Huston [0056]
- US 4946778 A [0056]
- US 5156952 A, Litman [0067]
- US 5030558 A [0067]
- US 5137808 A, Ullman [0067]
- US 4857453 A [0067] [0073]
- US 4981768 A, Dafforn [0067]
- EP 89118378 A [0067]
- US 4806312 A, Greenquist [0067]
- US 5114673 A, Berger [0067]
- US 4632901 A, Valkirs [0070]
- EP 0229359 A, Kromer [0071]
- US 4366241 A, Tom [0072]
- EP 0143574 A, Zuk [0072]
- US 4770853 A, Bernstein [0072]
- WO 8808534 A, May [0072] [0073]
- EP 0299428 A, Ching [0072]
- US 4313734 A, Leuvering [0073]
- US 4373932 A, Gribnau [0073]
- EP 0280559 A, Snyder [0073]
- EP 0281327 A [0073]
- US 4703017 A, Campbell [0073]
- US 3817837 A, Rubenstein and Ullman [0077]
- US 4906439 A [0078]
- US 4918025 A [0078]
- US 5051237 A [0079]
- US 5138868 A [0079]
- US 5141871 A [0079]
- US 5147609 A [0079]
- US 5352582 A, Lichtenwalter [0080]
- US 4810658 A [0080]
- US 4978503 A [0080]
- US 5186897 A [0080]

Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- LOCKWOOD C. J. et al. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1994, vol. 171 (1), 146-150 [0004]
- M. L. FRIEDMAN ; T. W. MCELIN. Diagnosis of Ruptured Fetal Membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1969, vol. 100, 544-550 [0004]
- GORODESKI I.G ; HAIMOVITZ L. ; BAHARI C. M. *Journal Perinat. Med.*, 1982, vol. 10 (6), 286-292 [0005]
- TROVO S. et al. *Minerva Ginecol.*, 1998, vol. 50 (12), 519-512 [0005]
- B. L. ROCHELSON et al. Rapid Assay – Possible Application in the Diagnosis of Premature Rupture of the Membranes. *Obstetrics and Gynecology*, 1983, vol. 62, 414-418 [0006]
- P.R. KONINCKX et al. Prolactin Concentration in Vaginal Fluid: a New Method for Diagnosing Ruptured Membranes. *British J. Obstetr. Gynecol.*, 1981, vol. 88, 607-610 [0006]
- P. HELLEMANS et al. Preliminary Results with the Use of the ROM Check Immunoassay in the Early Detection of Rupture of the Amniotic Membranes. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 1992, vol. 43 (3), 173-179 [0006]
- RUTANEN, E.M. et al. Measurement of Insulin-like Growth-Factor binding Protein-1 in Cervical/Vaginal Secretions: Comparison with the ROM Check Membrane Immunoassay in the Diagnosis of Ruptured Fetal Membranes. *Clin. Chim. Acta.*, 1993, vol. 214, 73-81 [0006]
- P. HELLEMANS. Preliminary Results with the Use of the ROM Check Immunoassay in the Early Detection of Rupture of the Amniotic Membranes. *Eur. J. Obstetr. Gynecol. Repros. Biol.*, 1992, vol. 43, 173-179 [0008]
- C. LOCKWOOD et al. Fetal Fibronectin in Cervical and Vaginal Secretions as a Predictor of Preterm Delivery. *New England Journal of Medicine*, 1991, vol. 325, 669-674 [0008]
- RUTANEN EM ; KARKKAINEN TH ; LEHTOVIRTA J. ; UOTILA JT ; HINKULAMK ; HARTIKAINEN AL. Evaluation of a rapid strip test for insulin-like growth factor binding protein-1 in the diagnosis of ruptured fetal membranes. *Clin Chim Acta*, 30 September 1996, vol. 253 (1-2), 91-101 [0010]
- WOLTMANN W. et al. Z. *Gebursh. Neonatal*, 1995, vol. 199, 243-244 [0013]

- **RAGOSCH, V. et al.** *Geburtsh. U. Frauenheilk.*, 1996, vol. 56, 291-296 [0014]
- **E. DARJ ; S. LYRENAS.** *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 1998, vol. 77, 295-297 [0015]
- 5 • **PETRUNIN D. et al.** *Akusherstvo i Ginekologia*, vol. 1, 64 [0020]
- Immunocliemical identification of organ specific human placental alpha-globulin and its concentration in amniotic fluid. *Akusherstvo i Ginekologia (Moscow*, January 1977, vol. 1, 64 [0020]
- 10 • **PETRUNIN, D. et al.** Comparative Study of Four Placental Protein During Gestation. *Akusherstvo i Ginekologia*, 1988, vol. 1, 50-52 [0021]
- 15 • **ZARAIISKY, E. et al.** *Voprosy Med. Khemii*, 1989, vol. 5, 131-132 [0021]
- **TATARINOV, Y. et al.** *Uspekhi Sour. Biologii*, 1990, vol. 109, 369-373 [0021]
- 20 • **BOLTOVSKAYA, M. et al.** *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 1991, vol. 7, 397-400 [0021]
- **NASIMOVA, S.V. et al.** *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, September 1993, vol. 116 (9), 302-304 [0021]
- 25 • Report on the Nomenclature of the IGF Binding Proteins. *Journ. Clin. Endocr. And Metabol.*, 1990, vol. 70, 817 [0025]
- **MARINARO J. A. et al.** O-glycosylation delays the clearance of human IGF-binding protein-6 from the circulation. *Eur J Endocrinol*, May 2000, vol. 142 (5), 512 [0038]
- 30 • **SCHNEEBERGER E.E.** Proteins and vesicular transport in capillary endothelium. *Fed Proc*, 15 May 1983, vol. 42 (8), 2419-24 [0038]
- 35 • **MINSHALL RD et al.** Vesicle formation and trafficking in endothelial cells and regulation of endothelial barrier function. *Histochem Cell Biol 2002 Fed*, 2002, vol. 117 (2), 105-12 [0038]
- 40 • **DEL VECCHIO PJ et al.** Endothelial monolayer permeability to macromolecules. *Fed Proc*, June 1987, vol. 46 (8), 2511-5 [0038]
- **SIFLINGER-BIRNBOIM A et al.** Selectivity of the endothelial monolayer: effects on increase permeability. *Microvasc Res*, November 1998, vol. 36 (3), 216-27 [0038]
- 45 • **GHINEA N ; MILGROM EA.** new function for the LH/CG receptor: transcytosis of hormone across the endothelial barrier in target organs. *Semin Reproduct Med*, 2001, vol. 19 (1), 97-101 [0038]
- 50 • **DIAMANDI A. et al.** Immunoassay of the Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-3. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, June 2000, vol. 85 (6), 2327-2333 [0046]
- 55 • **D. PETRUNIN et al.** Immunological Identification of Organ Specific alpha-1 Globulin of Human Placenta and Its Content in the Amniotic Fluid. *Akusherstvo i Ginekologiya*, 1977, vol. 1, 64-65 [0047]
- **BOHN et al.** Isolierung und Charakterisierung eines Neuen Placentaspezifischen Proteins (PP12. *Arch. Gynecol.*, vol. 229, 279-291 [0048]
- **S. BELL et al.** *American Journal of Reproductive Immunology*, 1989, vol. 20, 87-96 [0048]
- Histochemical and Clinico-Diagnostic Study of the Placental Alpha-Microglobulin [PAMG-1] Using Monoclonal Antibodies. **BOLTOVSKAYA, M. N. et al.** *Bulletin of Experimental. Biology and Medicine*. 1991, vol. 10, 397-400 [0049]
- **TATARINOV, Y. et al.** *Uspekhi Sovr. Biologii*, 1990, vol. 109, 369-373 [0051]
- **KOHLER ; MILSTEIN.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495-497 [0055]
- **KOZBOR et al.** *Immunology Today*, 1983, vol. 4, 72 [0055]
- **COTE et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1983, vol. 80, 2026-2030 [0055]
- **COLE et al.** Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. Alan R. Liss, Inc, 1985, 77-96 [0055]
- **MORRISON et al.** *J. Bacteriol.*, 1984, vol. 159, 870 [0055]
- **NEUBERGER et al.** *Nature*, 1984, vol. 312, 604-608 [0055]
- **TAKEDA et al.** *Nature*, 1985, vol. 314, 452-454 [0055]
- **HUSE et al.** *Science*, 1989, vol. 246, 1275-1281 [0056]
- *Methods in Enzymology*, 1980, vol. 70, 166-198 [0062]
- **ELVIN A. LABAT.** Basic Principles of Antigen-Antibody Reaction. *Methods in Enzymology*, 1980, vol. 70, 3-70 [0063]
- **EVA ENGVALL.** *Enzyme Immunoassay* [0073]
- **ELISA ; EMIT.** *Methods in Enzymology*, 1980, vol. 70, 419-439 [0073]
- **G. A. ROBINS.** *Advances in Biosensors*, 1991, vol. 1, 229-256 [0080]
- **R. A. BRADY et al.** *Phil. Trans. R. Soc. Land. B*, 1987, vol. 316, 143-160 [0080]
- **G. A. ROBINSON et al.** *Sensors and Actuators.* Elsevier, 1992 [0080]
- **ROBINSON, G. A.** *Optical Immunosensors: An Overview, Advances in Biosensors*, 1991, vol. 1, 229-256 [0081]
- **MARINARO J. A. et al.** O-glycosylation delays the clearance of human IGF-binding protein-6 from the circulation. *European Journal of Endocrinology*, May 2000, vol. 142 (5), 512 [0115]
- **SCHNEEBERGER E. E.** Proteins and vesicular transport in capillary endothelium. *Fed. Proc.*, May 1983, vol. 42 (8), 2419-24 [0115]
- **MINSHALL R. D. et al.** Vesicle formation and trafficking in endothelial cells and regulation of endothelial barrier function. *Histochem. Cell Biol.*, February 2002, vol. 117 (2), 105-12 [0115]
- **DEL VECCHIO P. J. et al.** Endothelial monolayer permeability to macromolecules. *Fed Proc*, June 1987, vol. 46 (8), 2511-2515 [0115]

- **SIFLINGER-BIRNBOIM A et al.** Selectivity of the endothelial monolayer: effects on increase permeability. *Microvascular Research*, November 1998, vol. 36 (3), 216-227 [0115]
- **GHINEA N. ; MILGROM, E. A.** New function for the LH/CG receptor: transcytosis of hormone across the endothelial barrier in target organs. *Semin. Reprod. Med.*, 2001, vol. 19 (1), 97-101 [0115]
- **PETRUNIN, D. D. ; KOZLYAEVA, G. A. ; TATARINOV, YU. S. ; SHEVCHENKO, O. P.** *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 1980, 558 [0123]