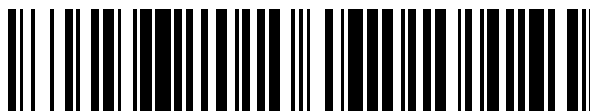


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 649**

51 Int. Cl.:

C07K 16/38 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2011 E 11826474 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 2619581**

54 Título: **Dispositivos, métodos y kits de inmunocromatografía**

30 Prioridad:

05.05.2011 US 201161482867 P
24.09.2010 US 386214 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
01.12.2015

73 Titular/es:

GRIFOLS THERAPEUTICS INC. (100.0%)
4101 Research Commons 79 T.W. Alexander
Drive
Research Triangle Park, NC 27709, US

72 Inventor/es:

GREBE, MARCO

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 552 649 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

Dispositivos, métodos y kits de inmunocromatografía

5 SECTOR DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a dispositivos y ensayos que implican la unión específica, en particular, dispositivos y ensayos inmunocromatográficos.

10 TÉCNICA ANTERIOR

De forma común, se utilizan varios procedimientos y dispositivos analíticos en ensayos dinámicos para determinar la presencia y/o la concentración de analitos que pueden estar presentes en una muestra de ensayo. Los ensayos de flujo lateral, también conocidos como ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral o ensayos de flujo lateral (LFA), se utilizan comúnmente, por ejemplo, en los dispositivos de diagnóstico médico del punto de cuidado (POC). Los diseños de ensayos individuales están adaptados a una aplicación particular.

La deficiencia de antitripsina alfa-1 (AATD) es una enfermedad hereditaria, que puede ser diagnosticada mediante ensayos genéticos. Sin embargo, la AATD está subdiagnosticada y sólo se identifica en un 10-15%. En algunos casos, pacientes no identificados son diagnosticados erróneamente con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) y el asma "habitual", respectivamente.

En el estado de la técnica se ha descrito ya un anticuerpo monoclonal contra AATZ, es decir ATZ11 y se han diseñado varios ensayos ELISA basados en dicho anticuerpo para la detección de la presencia del alelo PiZ. Ninguno de los ensayos ELISA generados es capaz de distinguir homocigotos o heterocigotos individuales para el alelo PiZ (STEN ERIKSSON Y OTROS: "Lack of Association between Hemochromatosis and [alpha]-Antitrypsin Deficiency", ACTA MEDICA SCANDINAVICA, vol. 219, no. 3, 12 Enero 1986 (1986-01-12), páginas 291-294; WALLMARK A Y OTROS: "MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC FOR THE MUTANT PiZ ALPHA1-ANTITRYPSIN AND ITS APPLICATION IN AN ELISA PROCEDURE FOR IDENTIFICATION OF PiZGENE CARRIERS", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 81, no. 18, 1 Septiembre 1984 (1984-09-01), páginas 5690-5693; GERSHAGEN, S. Y OTROS: "ELISA for specific detection of PiZ-related alphas-antitrypsin deficiency.", CLIN. CHEM., vol. 50, no. 12, 2004, páginas 2407-2410; and JANCIAUSKIENE, S. Y OTROS: "Detection of circulating and endothelial cell polymers of Z and wild type alphas-antitrypsin by a monoclonal antibody", J. BIOL. CHEM., vol. 277, no. 29, 2002, páginas 26540-26546)

Es interesante observar que anticuerpos monoclonales específicos contra AATZ no solamente se han utilizado en ensayos ELISA, sino también para marcar secciones de tejido de hígado. De esta manera, se ha demostrado que una nueva variante similar a M (M Cagliari) no se relaciona con la variante Z puesto que muestra diferente antigenicidad (SERGI, C. Y OTROS: "Immunohistochemical and genetic characterization of the M Cagliari alpha-1-antitrypsin molecule (M-like alpha-1-antitrypsin deficiency).", LAB. INVEST., vol. 70, no. 1, 1994, páginas 130-133).

La solicitud de Patente de Estados Unidos US20110294201 da a conocer un dispositivo de prueba que está destinado a constituir un dispositivo de "todo en uno" (es decir, para llevar a cabo secuencialmente y en orden todas las reacciones requeridas para llevar a cabo una prueba de diagnóstico) y preferentemente tiene forma de tubo, Comprende una zona de alimentación para añadir un fluido corporal (preferentemente sangre). Una vez la muestra ha sido aplicada mediante un capilar, se puede cortar o arrancar una barrera de manera que dicha muestra pueda avanzar a través de los diferentes cartuchos que contienen reactivos de interés y pasar luego a un área de indicación a través de un orificio.

La solicitud de Patente de Estados Unidos US2003/092090 da a conocer un dispositivo de prueba para detectar la presencia de proteína de priones, basada en inmunocromatografía, en el que la tira de pruebas tiene varios componentes o partes: zona absorbente para aplicar la muestra, zona con proteinasa K inmovilizada para digerir la proteína original de priones (opcional), zona conjugada, en la que la muestra reacciona con un reactivo marcado, zona separadora o almohadilla (opcional), zona de detección (con una prueba en línea y, opcionalmente, una línea de control) y una almohadilla de capilaridad (opcional) para impulsar el líquido a través de la tira.

La solicitud de Patente de Estados Unidos US2006/246513 da a conocer un dispositivo o aparato de prueba que permite la detección de la presencia o ausencia de uno o varios analitos en una muestra líquida. El dispositivo de pruebas que da a conocer tiene la forma de una inmunocromatografía de todo en uno con una almohadilla de muestra, en la que la muestra es aplicada y reacciona con los correspondientes marcadores, una zona de quelado para eliminar el exceso de marcador, una ventana de observación (con una línea de prueba y una línea de control) y una almohadilla absorbente para impulsar el líquido a través del dispositivo.

65

Existe todavía la necesidad de un ensayo de flujo lateral eficaz para determinar la presencia de un analito, en particular una proteína Z-AAT.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención da a conocer un dispositivo de inmunocromatografía que comprende una membrana que tiene un anticuerpo de captura unido a la misma en una zona de ensayo, en el que el anticuerpo de captura es capaz de unirse con un analito y en el que el dispositivo comprende además una estructura conjugada acoplada fluidicamente a la membrana en un extremo próximo, de manera que la estructura conjugada comprende un anticuerpo detector que tiene una fracción informadora conjugada al mismo de manera que el analito es una proteína Z-AAT presente en una muestra de un portador del gen PiZ, de manera que el anticuerpo de captura es: el anticuerpo monoclonal LG96, producido por células de hibridoma depositadas bajo el nº de Acceso DSM ACC3092; o el anticuerpo monoclonal MG97, producido por células de hibridoma depositadas bajo el nº de Acceso DSM ACC3093; y en el que el anticuerpo detector es: anticuerpo monoclonal LG96, producido por células de hibridoma depositadas bajo el nº de Acceso DSM ACC3092; o anticuerpo monoclonal MG97, producido por células de hibridoma depositadas según el nº de Acceso DSM ACC3093.

En algunos aspectos, la presente invención da a conocer un dispositivo de inmunoensayo que comprende:

- una membrana que tiene una zona de captura de proteínas Z-AAT definida por un anticuerpo de captura inmovilizado en la misma, en la que el anticuerpo de captura es un anticuerpo de proteína anti Z-AAT;
- una zona de aplicación de muestra y una trayectoria de flujo desde la zona de aplicación de muestra a la zona de captura de proteína Z-AAT; y
- una estructura conjugada situada en la trayectoria de flujo, de manera que la estructura conjugada comprende un reactivo de detección específico para la proteína Z-AAT, siendo el reactivo de detección móvil o movilizable,

en el que el anticuerpo de captura es: anticuerpo monoclonal LG96 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092; o anticuerpo monoclonal MG97 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093; y en el que el reactivo de detección es un anticuerpo detector seleccionado entre: anticuerpo monoclonal LG96 producido por células de hibridoma depositadas según nº de Acceso DSM ACC3092; o anticuerpo monoclonal MG97 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093.

En otros aspectos, la presente invención da a conocer un dispositivo de inmunoensayo para determinar la presencia o la cantidad de una proteína Z-AAT en una muestra de fluido. El dispositivo comprende:

- una zona de aplicación de muestras;
- una membrana microporosa que tiene una zona de captura de proteínas Z-AAT definida por un anticuerpo de captura inmovilizado en la misma, en la que el anticuerpo de captura es LG96, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092; una trayectoria de flujo desde la zona de aplicación de la muestra a la zona de captura de proteína Z-AAT, de manera que la presencia o cantidad de la proteína Z-AAT en una muestra de fluido se puede determinar por formación de un complejo entre el anticuerpo de captura y la proteína Z-AAT que puede encontrarse presente en la muestra de fluido; y
- una estructura conjugada situada en la trayectoria de flujo, de manera que la estructura conjugada comprende un reactivo de detección específico para la proteína Z-AAT, siendo el reactivo de detección móvil o movilizable, en el que el reactivo de detección es LG96 conjugado de oro, producido por células de hibridoma depositadas según nº de Acceso DSM ACC3092.

En un aspecto, se da a conocer un procedimiento para detectar una proteína Z-AAT en un individuo. El procedimiento comprende:

- aplicar una muestra biológica del individuo al dispositivo de inmunoensayo de la presente invención; y
- detectar un complejo que se forma entre el anticuerpo de captura y la proteína Z-AAT que se puede encontrar presente en la muestra de fluido, de manera que la detección del complejo indica la presencia de la proteína Z-AAT en la muestra.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer un método para determinar un portador del gen PiZ. El método comprende someter a inmunocromatografía una muestra de un individuo utilizando un dispositivo según la presente invención; y determinar la unión de un analito a un anticuerpo de captura, en el que la unión del analito al anticuerpo de captura indica que el individuo es un portador de PiZ.

En algunos aspectos, la presente invención da a conocer un método para diagnosticar una afección o enfermedad asociada con la deficiencia de AAT. El método comprende someter a inmunocromatografía una muestra de un individuo utilizando un dispositivo según la presente invención, y determinar la unión de un analito a un anticuerpo de captura, en el que la unión del analito al anticuerpo de captura indica que el individuo tiene la afección o la enfermedad.

En otros aspectos, la presente invención da a conocer un método para determinar la predisposición de un individuo a desarrollar una afección o enfermedad asociada con la deficiencia de AAT. El método comprende someter a inmunocromatografía una muestra de un individuo utilizando un dispositivo según la presente invención, y determinar la unión de un analito a un anticuerpo de captura, en el que la unión del analito al anticuerpo de captura es indicativa de la predisposición del individuo al desarrollo de la afección o enfermedad.

En otros aspectos, la presente invención da a conocer un kit que comprende un dispositivo de acuerdo con la presente invención, y un anticuerpo detector que tiene una fracción informadora conjugada del mismo.

En otra realización, la presente invención da a conocer un anticuerpo monoclonal LG96 producido por células de hibridoma depositadas bajo nº de Acceso DSM ACC3092; y el anticuerpo monoclonal MG97 producido por células de hibridoma depositadas bajo nº de Acceso DSM ACC3093.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra los resultados de los ensayos de ELISA de tipo sándwich por parejas coincidentes, con anticuerpos monoclonales LG96 y MG97. Se utilizaron anticuerpos monoclonales LG96 y MG97 parcialmente purificados bien como anticuerpos de captura o bien como anticuerpos de detección marcados con peroxidasa de rábano picante (LG96HRP o MG97HRP respectivamente). Sueros ZZ o MM agrupados fueron diluidos en serie con solución tampón de muestra y se utilizaron como solución de antígeno. Las parejas coincidentes LG96-LG96HRP, LG96-MG97HRP, MG97-LG96HRP y MG97-MG97HRP muestran una unión específica con suero PiZZ, pero no con suero PiMM.

La figura 2 muestra los resultados de ensayos de reactividad cruzada de anticuerpos monoclonales LG96 y MG97 con AAT recubierta (forma M). Los anticuerpos específicos de M F43.8.1 y 1AT actúan como controles positivos y ambos muestran una unión específica muy fuerte con AAT recubierta (forma M). Por el contrario, los anticuerpos LG96 y MG97 no muestran unión a la forma M de AAT recubierta.

La figura 3 ilustra un diagrama esquemático de un dispositivo de ensayo de flujo lateral (LFA) para inmunocromatografía según una realización de la presente invención.

La figura 4 ilustra un diagrama esquemático, tal como el de la figura 3, en el que la muestra no contiene el analito diana.

La figura 5 es una imagen de un dispositivo de FLA, en el que los componentes de inmunocromatografía se representan alojados en una carcasa hecha, por ejemplo, de un material plástico. La línea o zona de ensayo se muestra como ausente lo que indica que los resultados del ensayo son negativos para la presencia del analito en la muestra. La línea o zona de control es positiva lo que indica que el dispositivo ha funcionado correctamente.

La figura 6 ilustra un diagrama esquemático, tal como el de la figura 3, en el que la muestra contiene el analito diana.

La figura 7 es una imagen de un dispositivo de FLA, en el que los componentes de inmunocromatografía se representan alojados en una carcasa, tal como en la figura 5. La línea o zona de ensayo se muestra presente lo que indica que los resultados del ensayo son positivos para la presencia del analito en la muestra. La línea o zona de control también es positiva lo que indica que el dispositivo ha funcionado correctamente.

La figura 8 ilustra el principio de un FLA según una realización de la presente invención, en el que la muestra es sangre de un individuo de tipo ZZ. Anticuerpo de captura LG96; anticuerpo de detección MG97 conjugado con HRP; anticuerpo de control: Ig.

La figura 9 ilustra el principio de un FLA según otra realización de la presente invención, en el que la muestra es sangre de un individuo de tipo MM. Anticuerpo de captura LG96; anticuerpo de detección MG97 conjugado con HRP; anticuerpo de control: Ig.

La figura 10 ilustra el principio de un FLA según otras realizaciones de la presente invención, en el que la muestra es sangre de un individuo de tipo MZ. Anticuerpo de captura LG96; anticuerpo de detección MG97 conjugado con HRP; anticuerpo de control: Ig.

La figura 11 muestra los resultados de las curvas de unión de LG96-MG97HRP sobre suero ZZ y MM.

La figura 12 muestra los resultados de la unión específica de LG96-MG97HRP en suero ZZ. Sin unión para suero MM.

La figura 13 muestra los resultados del cribado de muestras reales (diluidas 1:20) en ensayos en blanco.

La figura 14 muestra la determinación de la concentración de Z-AAT en diferentes muestras de suero/plasma disponibles comercialmente e internas utilizando ELISA de PiZZ.

5 Las figuras 15A-15D muestran el análisis de muestras de suero #1-6 en cada combinación posible de anticuerpos, en el que el anticuerpo mencionado primero es el anticuerpo de captura inmovilizado sobre la nitrocelulosa, y el anticuerpo mencionado después de la barra es el anticuerpo de detección acoplado a las partículas de oro.

La figura 16 muestra una vista lateral de una realización de un dispositivo de la presente invención.

10 La figura 17 es una sección longitudinal del dispositivo mostrado en la figura 16.

La figura 18 es una vista ampliada del área de alimentación del dispositivo mostrado en la figura 16.

15 La figura 19 es una representación ampliada del área de reacción de: (A) el dispositivo mostrado en la figura 16, y (B) otra realización de un dispositivo, en el que el dispositivo comprende un solo cartucho.

La figura 20 muestra una vista lateral de la tapa y la sección de corte del dispositivo mostrado en la figura 16.

20 La figura 21 es una sección longitudinal de una realización de un dispositivo de la presente invención.

La figura 22 es otra realización de un dispositivo de la presente invención.

La figura 23 es un dispositivo de la presente invención según algunas realizaciones.

25 La figura 24 es un dispositivo de la presente invención según otras realizaciones.

La figura 25 es un dispositivo de la presente invención según otras realizaciones adicionales.

30 La figura 26 muestra los resultados de tres cribados separados de muestras de suero ZZ(+) utilizando una realización de un dispositivo de la presente invención.

La figura 27 muestra el ensayo de sangre capilar frente a muestras de suero (comparación de 20 µl de sangre capilar y muestra de suero del mismo donante). Las señales de ensayo se midieron después de 15 minutos utilizando un lector óptico (lector QuickSens Omega 100). Los números en mg/dl indican los niveles en suero de AAT determinados por nefelometría.

La figura 28 muestra el efecto de diferentes anticoagulantes en resultados de ensayos. Control: suero MM. Muestras de ensayo: plasma ZZ-EDTA, plasma ZZ-citrato, plasma ZZ-heparina. Las señales de ensayo se midieron con un lector óptico 15 minutos después de comenzar el ensayo. Los números en mg/dl indican los niveles en suero de AAT determinados por nefelometría.

La figura 29 muestra el análisis de muestras de suero procedentes de: (A) donante MM; (B) donante ZZ, y (C) donante SZ (se utilizaron muestras de suero de 20 µl y los resultados se muestran después de diferentes tiempos). 'Vol. es intensidad de la señal de la línea de ensayo (T) medida por un lector óptico. La línea de control se designa por "C":

La figura 30 muestra un resumen de n=65 ensayos con suero y sangre entera. 0 = muestras PiMM, 1 = muestras PiMZ, PiSZ y PiZZ. Las señales de ensayo se midieron después de 15-20 minutos utilizando un lector óptico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención da a conocer un dispositivo de inmunocromatografía que comprende una membrana que tiene un anticuerpo de captura unido a la misma en una zona de ensayo, en el que el anticuerpo de captura es capaz de unirse con un analito y en el que el dispositivo comprende además una estructura conjugada acoplada fluidicamente a la membrana en un extremo próximo, de manera que la estructura conjugada comprende un anticuerpo detector que tiene una fracción informadora conjugada del mismo en el que el analito es una proteína Z-AAT presente en una muestra del portador de gen PiZ, en el que el anticuerpo de captura es: anticuerpo monoclonal LG96, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092; o anticuerpo monoclonal MG97, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093; y en el que el anticuerpo detector es: anticuerpo monoclonal LG96, producido por células de hibridoma depositadas según nº de Acceso DSM ACC3092; o anticuerpo monoclonal MG97, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093. El dispositivo se puede utilizar para determinar la presencia del analito en una muestra.

65 Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "proteína Z-AAT", se refiere a un polímero o polímeros de aminoácidos Z-AAT y no se pretende hacer referencia a una longitud específica de la proteína; de este

modo, los fragmentos de la misma están incluidos dentro de la definición de "proteína Z-AAT". Este término incluye también formas, variantes, y análogos de la proteína Z-AAT entre los que se incluyen monómeros, dímeros, multímeros, etc., así como modificaciones post-traduccionales de la proteína, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares. De este modo, en algunas realizaciones, el término "proteína Z-AAT" puede ser sinónimo del término "polipéptido Z-AAT" o puede referirse a un complejo de dos o más polipéptidos Z-AAT (por ejemplo, diméricos, multiméricos, agregados).

Muestra

En general, la muestra, se refiere a un material que puede contener o no el analito. La muestra se puede utilizar directamente tal como se obtiene de una fuente de procedencia o después de un tratamiento previo para modificar o alterar una característica de la muestra. La fuente de la muestra puede ser cualquier fuente biológica, tal como un fluido fisiológico, entre los que se incluyen, sin que constituyan limitación, sangre, fluido intersticial, saliva, fluido de la lente ocular, fluido espinal cerebral, sudor, orina, leche, líquido ascítico, mucosidades, líquido sinovial, líquido peritoneal, fluido vaginal, fluido amniótico o similares. Preferentemente, la muestra es una muestra acuosa.

En algunas realizaciones, la muestra es una muestra no diluida, es decir, la muestra se obtiene de la fuente biológica y se aplica directamente al dispositivo sin dilución previa de la muestra. En otras realizaciones, la muestra se trata previamente antes de su utilización, tal como preparando el plasma a partir de sangre, diluyendo los fluidos viscosos, y similares. El tratamiento previo de la muestra puede incluir filtración, precipitación, dilución, destilación, concentración, inactivación de componentes interferentes, y adición de reactivos. En una realización, un material sólido sospechoso de contener el analito puede ser utilizado como la fuente de la muestra, preferentemente mediante la modificación del material sólido para formar una composición líquida o semilíquida.

En una realización, la muestra es sangre completa, plasma o suero. En otra realización, la muestra es sangre capilar.

Membrana

El dispositivo de la presente invención da a conocer un ensayo inmunocromatográfico basado en membranas para determinar la presencia o la cantidad del analito en la muestra, tal como se define en las reivindicaciones. El analito es una proteína Z-AAT. Por ejemplo, en una realización, el analito es una proteína Z-AAT, en la que la presencia del analito en una muestra de sangre obtenida de un mamífero (por ejemplo, humano) indica que el mamífero es un portador del gen PiZ.

La membrana se puede preparar a partir de cualquiera de una variedad de materiales a través de los que la muestra es capaz de pasar. Por ejemplo, entre los materiales utilizados para formar la membrana se pueden incluir, sin que constituyan limitación, materiales naturales, sintéticos, o de origen natural que están modificados sintéticamente, tales como polisacáridos (por ejemplo, materiales de celulosa tales como papel y derivados de celulosa, tales como acetato de celulosa y nitrocelulosa); poliéter sulfona; membranas de nailon, sílice, materiales inorgánicos, tales como alúmina desactivada, tierra de diatomeas, $MgSO_4$, u otro material inorgánico finamente dividido uniformemente dispersado en una matriz polimérica porosa, con polímeros tales como cloruro de vinilo, copolímero de cloruro de vinilo-propileno, y copolímero de cloruro de vinilo-acetato de vinilo; tejido, tanto de origen natural (por ejemplo, algodón) como sintético (por ejemplo, nailon o rayón); geles porosos, tales como gel de sílice, agarosa, dextrano y gelatina; películas poliméricas, tales como poliacrilamida, y similares.

En una realización, la membrana se forma a partir de materiales de nitrocelulosa y/o de poliéster sulfona. La nitrocelulosa puede ser de ésteres de ácido nítrico de celulosa, que pueden ser sólo de nitrocelulosa o un éster mixto de ácido nítrico y otros ácidos, tales como ácidos carboxílicos alifáticos que tienen uno o más átomos de carbono.

En algunas realizaciones, la membrana comprende nitrocelulosa. La nitrocelulosa puede tener la capacidad de unirse a proteínas sin requerir la sensibilización previa. Ciertos reactivos, tales como anticuerpos, se pueden aplicar directamente a la nitrocelulosa e inmovilizarse sobre la misma. Se requiere poco tratamiento químico del mismo o ninguno, que podría interferir con la actividad de unión específica esencial del reactivo. Posteriormente, los sitios de unión sobre la nitrocelulosa no utilizados se pueden bloquear utilizando materiales simples, tales como alcohol de polivinilo. Por otra parte, la nitrocelulosa está disponible fácilmente en una gama de tamaños de poro y esto facilita la selección de un material de membrana para satisfacer requisitos en particular, tales como el caudal de la muestra, etc.

En una realización, la membrana comprende una única zona o línea o región de ensayo que tiene el anticuerpo de captura unido a la misma.

En otras realizaciones, la membrana comprende una pluralidad de zonas de ensayo dispuestas, por ejemplo, en serie, sobre la membrana, a través de las que la muestra acuosa puede pasar progresivamente. En una realización, la pluralidad de zonas de ensayo se puede utilizar para proporcionar una medición cuantitativa del analito o, en otra

realización, se pueden cargar individualmente con diferentes anticuerpos de captura específicos para proporcionar un ensayo para múltiples analitos.

En otras realizaciones adicionales, la membrana comprende una zona de control para proporcionar una determinación de que el dispositivo ha funcionado. Preferentemente, la zona de control está ubicada aguas debajo de la zona o zonas de ensayo en las que se determina el resultado del ensayo deseado. Por lo tanto, un indicador de control positivo proporciona información de que la muestra ha penetrado, como mínimo, la distancia requerida a través de la membrana.

Por ejemplo, la zona de control se puede cargar con un anticuerpo u otra molécula/reactivo que se unirá a un reactivo de detección para confirmar que la muestra ha permeado suficientemente a través de la membrana. Por ejemplo, en los casos en los que el reactivo de detección es un anticuerpo marcado derivado de un hibridoma murino, la zona de control puede comprender un anticuerpo "anti-ratón" (por ejemplo, IgG anti-ratón). En otra realización, la zona de control puede contener un reactivo anhidro que, cuando se humedece, produce un cambio de color o la formación de color, por ejemplo, sulfato de cobre anhidro que se vuelve azul cuando se humedece con una muestra acuosa. Como una realización adicional, una zona de control puede contener analito inmovilizado (por ejemplo, proteína Z-AAT) que reaccionará con el exceso de reactivo de detección.

En una realización, la membrana comprende una zona de control que tiene un anticuerpo de control unido a la misma, en la que el anticuerpo de control es capaz de unirse con el reactivo de detección. En algunas realizaciones, el anticuerpo de control es una IgG anti-ratón.

Anticuerpo de captura

El anticuerpo de captura que está unido a la membrana en la zona de ensayo es un anticuerpo, que es específico para la proteína Z-AAT. El anticuerpo, presenta sustancialmente poca o ninguna reactividad cruzada con sueros PiMM o AAT purificada de tipo salvaje. El anticuerpo de captura es: anticuerpo monoclonal LG96 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092; o anticuerpo monoclonal MG97 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093.

Los términos "policlonal" y "monoclonal" se refieren al grado de homogeneidad de una preparación de anticuerpos, y no se pretende que estén limitados a métodos de producción particulares. El término "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen sólo una especie de sitio de unión al antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítipo particular.

Entre los fragmentos de anticuerpos se incluyen, sin que constituyan limitación, anticuerpos de cadena única, quiméricos, humanizados, primatizados, o también se contemplan "revestidos" ("veneered"). Por ejemplo, entre los fragmentos de anticuerpos capaces de unirse específicamente a la proteína Z-AAT se pueden incluir, sin que constituyan limitación, Fab', Fab, F(ab')₂, anticuerpos de dominio único (DABs), Fv, scFv (Fv de cadena única), anticuerpos lineales, diacuerpos, anticuerpos camélidos y similares. Las técnicas para preparar y utilizar diversas construcciones y fragmentos basados en anticuerpos son bien conocidas en la técnica. Tales fragmentos pueden ser producidos por escisión enzimática o mediante técnicas recombinantes. Por ejemplo, la escisión con papaina o pepsina puede generar respectivamente fragmentos Fab o F(ab')₂. También se pueden utilizar otras proteasas con la especificidad de sustrato requerida para generar fragmentos Fab o F(ab')₂. Los anticuerpos también se pueden producir en una variedad de formas truncadas utilizando genes de anticuerpos en los que uno o más codones de terminación han sido introducidos aguas arriba del sitio de terminación natural. Por ejemplo, un gen quimérico que codifica un fragmento de cadena pesada F(ab')₂ puede ser diseñado para incluir secuencias de ADN que codifican el dominio CH₁ y la región "bisagra" de la cadena pesada.

La presente invención abarca también anticuerpos de cadena única, y anticuerpos quiméricos, humanizados o primatizados (injetados con una región determinante de la complementariedad (injetados con CDR), o anticuerpos "revestidos", así como quiméricos, injertados con CDR o anticuerpos "revestidos" de cadena sencilla, que comprenden partes derivadas de diferentes especies, y similares. Las diferentes partes de estos anticuerpos pueden unirse entre sí químicamente mediante técnicas convencionales, o pueden prepararse como una proteína contigua utilizando técnicas de ingeniería genética.

En una realización, el anticuerpo de captura es un anticuerpo monoclonal MG97, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093; y el anticuerpo detector es el anticuerpo monoclonal LG96, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092. En una realización, el anticuerpo de captura es el anticuerpo monoclonal LG96, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092; y el anticuerpo de captura es el anticuerpo monoclonal LG96, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092.

Muestras de células representativas de las líneas celulares de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales LG96 y MG97 se depositaron el 14 de septiembre de 2010 en la "Deutsche Sammlung von

Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" ("Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares"), Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Alemania, dentro de los términos del Tratado de Budapest bajo números de acceso DSM ACC3092 y DSM ACC3093, respectivamente.

Un experto habitual en la técnica puede determinar las secuencias de ácido nucleico de anticuerpos monoclonales utilizando múltiples técnicas conocidas en la materia. Los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos monoclonales se pueden clonar para preparar un anticuerpo monoclonal "recombinante". Se puede utilizar, cualquier técnica de clonación recombinante, entre las que se incluye la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para cebar la síntesis de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos. Por lo tanto, entre los métodos de preparación de anticuerpos monoclonales se incluyen métodos que comprenden la obtención, como mínimo, de una primera molécula o segmento de ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-Z-AAT adecuado a partir de una célula productora de anticuerpos anti-Z-AAT adecuada, preferentemente un hibridoma, y la expresión de la molécula o segmento de ácido nucleico en una célula huésped recombinante para obtener un anticuerpo monoclonal anti-Z-AAT recombinante. Otras técnicas recombinantes son conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, los métodos basados en biblioteca de fagémidos. Por ejemplo, el método puede comprender: (a) inmunizar un animal mediante la administración al animal, como mínimo, de una dosis y, opcionalmente, más de una dosis, de una composición que comprende una cantidad inmunogénicamente eficaz de una proteína Z-AAT inmunogénica, preferentemente una composición que comprende células endoteliales activadas; (b) preparar una biblioteca combinatoria de fagémidos de inmunoglobulina que expresan ARN aislado de las células productoras de anticuerpos, preferentemente del bazo, del animal inmunizado; (c) seleccionar de la biblioteca de fagémidos, como mínimo, un primer clon que expresa, como mínimo, un primer anticuerpo anti-Z-AAT, opcionalmente uno que sustancialmente reacciona de forma cruzada o compite con el anticuerpo monoclonal LG96 o MG97; (d) obtener ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo anti-Z-AAT, como mínimo, a partir de un primer clon seleccionado y expresar los ácidos nucleicos en una célula huésped recombinante para proporcionar, como mínimo, el primer anticuerpo anti-Z-AAT, y (e) obtener, como mínimo, un primer anticuerpo anti-Z-AAT expresado por los ácidos nucleicos obtenidos, como mínimo, a partir del primer clon seleccionado.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno con una especificidad epitópica que es igual a la de los anticuerpos monoclonales LG96 o MG97, o es similar a la misma, se pueden identificar por una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo con la especificidad epitópica igual o similar se puede identificar en base a la capacidad de competir con el anticuerpo monoclonal por la unión a un polipéptido Z-AAT. En otro ejemplo, la unión de, por ejemplo, mAb LG96, y la unión de un anticuerpo con la especificidad epitópica igual o similar a un polipéptido Z-AAT puede ser inhibida por un solo péptido (por ejemplo, un péptido natural, un péptido sintético).

Sin querer quedar limitado por ninguna teoría particular, se cree que un problema con concentraciones de analito elevadas en una muestra a ensayar puede ser el denominado "efecto Hook", que se entiende por un experto habitual en la técnica como una disminución de la señal detectable a concentraciones muy elevadas de analito. Normalmente, en un formato de ensayo de tipo sándwich heterogéneo, el anticuerpo marcado soluble (por ejemplo, reactivo de detección) y el anticuerpo de fase sólida (por ejemplo, anticuerpo de captura) están presentes en un exceso con relación al analito que se determina, de manera que se pueden formar los complejos sándwich y también detectar esencialmente por completo. Sin embargo, en presencia de una concentración elevada de analito, un número limitado de anticuerpos se enfrentan a un número muy grande de moléculas de analito que pueden estar presentes en la muestra. En el caso extremo, hay un déficit de anticuerpo de fase sólida de tal manera que el analito está sólo parcialmente unido y, por otra parte, la fracción de analito unido a la fase sólida no puede ser completamente detectada debido a que el anticuerpo marcado es capturado por el exceso de analito, con formación de complejos solubles de anticuerpo de detección/analito. Esto puede dar como resultado una reducción de la señal de medida que puede conducir a un resultado de falso negativo.

En algunas realizaciones, la muestra es una muestra diluida previamente, que después se somete a la inmunocromatografía.

En otras realizaciones, la membrana comprende una o más zonas de captura dispuestas (por ejemplo, en serie) sobre la membrana, cada una en una posición próxima a la zona o zonas de ensayo, a través de las que la muestra acuosa puede pasar progresivamente antes de alcanzar la zona o zonas de ensayo. En algunas realizaciones, la zona o zonas de captura comprenden los anticuerpos monoclonales LG96 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092; o MG97 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093, inmovilizados/unidos a las mismas. La zona o zonas de captura se pueden proporcionar para la prevención, reducción o eliminación del efecto gancho en los ensayos de muestras que potencialmente están sometidas a este efecto.

Estructura conjugada

En una realización, el dispositivo comprende además una estructura conjugada que tiene un reactivo de detección, tal como un anticuerpo de detección marcado con un grupo informador, en el que el anticuerpo detector es seleccionado entre: anticuerpo monoclonal LG96 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso

DSM ACC3092; o anticuerpo monoclonal MG97 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093.

En algunas realizaciones, la estructura conjugada se coloca en contacto con la membrana, en la que cuando un líquido se pone en contacto con la estructura conjugada, el reactivo de detección se rehidrata y se transporta a través de la membrana.

En otras realizaciones, la estructura conjugada se acopla en línea de fluido a la membrana en un extremo proximal de la membrana.

En otra realización, la estructura conjugada es una almohadilla conjugada que se superpone parcialmente con la membrana en el extremo proximal de la membrana.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la estructura conjugada se hace de un material absorbente, poroso o fibroso capaz de absorber líquido rápidamente. La porosidad del material puede ser unidireccional (por ejemplo, con poros o fibras que discurren total o predominantemente paralelos a un eje de la estructura) o multidireccional (por ejemplo, omnidireccional, de modo que el miembro tiene una estructura amorfa de tipo esponja). Se pueden utilizar materiales plásticos porosos, tales como polipropileno, polietileno, fluoruro de polivinilideno, acetato de vinilo-etileno, acrilonitrilo y politetrafluoroetileno. Puede ser ventajoso tratar previamente el material con un agente surfactante durante su fabricación, ya que esto puede reducir cualquier hidrofobicidad inherente en el material y, por lo tanto, aumentar su capacidad de absorber y liberar una muestra húmeda con rapidez y eficacia. La estructura porosa puede estar fabricada además de papel u otros materiales celulósicos, tales como nitrocelulosa. En algunas realizaciones, se pueden utilizar los materiales que se utilizan actualmente en las puntas de los denominados lápices con punta de fibra y estos materiales se pueden conformar o extruir en una variedad de longitudes y secciones transversales apropiadas en el contexto de la presente invención. Preferentemente, el material que comprende la estructura conjugada porosa se elige de manera que el material poroso se puede saturar con líquido acuoso en cuestión de segundos. Preferentemente, el material sigue siendo sólido cuando está húmedo.

En otras realizaciones, la estructura conjugada es un acabado o recubrimiento sobre el que se deposita una capa de reactivo de detección. En una realización, una parte de la membrana porta la estructura conjugada. Un experto en la técnica apreciará que, en la práctica, el acabado/recubrimiento puede no formar una capa superficial verdadera y el material de acabado/recubrimiento puede penetrar en el espesor de la membrana en cierta extensión. El reactivo de detección depositado puede penetrar también en la membrana. Según estas realizaciones, una muestra acuosa puede fluir a lo largo de la longitud de la membrana y, al hacerlo, disuelve el acabado/recubrimiento y moviliza el reactivo de detección, y transporta el reactivo de detección a lo largo de la membrana.

Reactivo de Detección

En realizaciones preferentes, el reactivo de detección es un anticuerpo de detección marcado con un grupo informador.

En una realización, el anticuerpo de detección es un anticuerpo, que es específico para la proteína Z-AAT, presenta sustancialmente poca o ninguna reactividad cruzada con sueros PiMM o AAT purificada de tipo salvaje y es seleccionado entre: anticuerpo monoclonal LG96 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092; o anticuerpo monoclonal MG97 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093.

En otras realizaciones, el anticuerpo de detección es el anticuerpo monoclonal MG97 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093, en el que el anticuerpo de captura es un anticuerpo monoclonal LG96 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092. En algunas realizaciones, el anticuerpo de detección es el anticuerpo monoclonal LG96 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092, en las que el anticuerpo de captura es un anticuerpo monoclonal MG97 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093. En algunas realizaciones, el anticuerpo de captura es el anticuerpo monoclonal LG96 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092; y el anticuerpo de detección es el anticuerpo monoclonal LG96 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092.

El fragmento informador puede ser cualquiera de una amplia gama de materiales/sistemas informadores conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, el fragmento informador comprende un primer miembro de un par ligando-receptor, entre los que se incluyen, sin que constituyan limitación, una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, luciferasa, β -galactosidasa, glucosa oxidasa, lisozima, malato deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa); dispersiones coloidales de metal, dispersiones coloidales de selenio, dispersiones coloidales de carbono, y similares; partículas coloreadas o coloreables (por ejemplo, partículas de látex coloreadas o coloreables); partículas coloidales metálicas (por ejemplo, oro coloidal, plata coloidal, platino coloidal, selenio coloidal). Entre los ejemplos de métodos conocidos en la técnica para detectar el informador se

incluyen, sin que constituyan limitación, los métodos de detección mediante inspección visual, espectrofotometría de ultravioleta (UV) y visible, fluorimetría y conteo de radiación.

El fragmento informador puede estar enlazado/acoplado covalente o no covalentemente con el anticuerpo de detección. El enlace/acoplamiento puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, entre los reactivos utilizados para el enlace/acoplamiento se incluyen, sin que constituyan limitación, glutaraldehído, p-tolueno diisocianato, diversos reactivos de carbodiimida, p-benzoquinona m-peryodato, N,N'-o-fenilendimaleimida, métodos recombinantes, y similares.

Sistema de separación sanguíneo

En otras realizaciones, el dispositivo comprende además un sistema de separación sanguíneo para recibir la muestra, en el que el sistema de separación sanguíneo está acoplado en línea de fluido a la estructura conjugada. En una realización, el sistema de separación de sangre es un sistema de separación sanguíneo que se superpone parcialmente con la almohadilla conjugada.

En algunas realizaciones, la muestra no tiene que ser aplicada directamente a la estructura conjugada o la sección de membrana del dispositivo. En una realización preferente, la muestra se aplica al sistema de separación sanguíneo (por ejemplo, material/almohadilla de absorción) que se acopla en línea de fluido a la estructura conjugada. Por ejemplo, el sistema de separación sanguíneo puede funcionar como un filtro, por ejemplo, para eliminar las células de sangre de la muestra. A continuación, la muestra filtrada puede llegar a la estructura conjugada. En otras realizaciones, durante el curso del proceso de filtración, se puede llevar a cabo al mismo tiempo la adición de reactivos mediante la disolución de estos últimos en los componentes presentes en el sistema de separación de la sangre en un estado seco. Se pueden eliminar factores de interferencia de la solución mediante estos componentes. De este modo, por ejemplo, el ácido ascórbico presente en una muestra, que podría interferir con la utilización de oxidasas y peroxidasas como agentes de marcaje, puede hacerse inefectivo con un agente oxidante adecuado. El sistema de separación de la sangre puede también funcionar como un adsorbente que elimina factores de interferencia de la muestra por adsorción.

Estructura distal

Preferentemente, el reactivo de detección (por ejemplo, el anticuerpo marcado) migra con la muestra líquida a la zona de ensayo. El flujo de muestra continúa más allá de la zona de ensayo y se aplica muestra de forma suficiente a la membrana con el fin de que esto pueda tener lugar. En algunas realizaciones, el dispositivo comprende además una estructura distal acoplada en línea de fluido con la membrana en un extremo distal de la membrana, en el que la estructura distal está configurada para proporcionar suficiente paso de flujo del extremo proximal al extremo distal. La estructura distal funciona, como mínimo, como un "sumidero" absorbente en el extremo distal de la membrana. El sumidero absorbente puede comprender, por ejemplo, papel de cromatografía Whatman 3MM.

En una realización, la estructura distal es una almohadilla adsorbente que se superpone parcialmente con la membrana en el extremo distal, en la que la almohadilla adsorbente está configurada para proporcionar suficiente paso de flujo del extremo proximal al distal de la membrana mediante acción capilar.

Métodos

En algunas realizaciones, en funcionamiento, una muestra acuosa se aplica al sistema de separación de la sangre en el extremo proximal del dispositivo. La muestra fluye por acción capilar a través de la estructura conjugada y transporta el reactivo de detección de la estructura conjugada a la zona o zonas de ensayo, a continuación a la zona de control para dar lugar, por ejemplo, a una señal de color observable a simple vista con independencia de si la muestra contiene o no el analito a determinar. La determinación del analito tiene lugar en la zona o zonas de ensayo. En algunas realizaciones, el usuario del dispositivo puede determinar si el analito está presente en la muestra comparando la señal producida en las dos áreas.

Por ejemplo, en una realización, si el ensayo se utiliza para determinar la presencia de una proteína Z-AAT en una muestra de sangre obtenida de un mamífero, el componente de la membrana del aparato puede comprender una única zona de ensayo que tiene anticuerpo monoclonal LG96 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092; inmovilizado sobre la misma, y una única zona de control que tiene inmovilizada sobre ella IgG anti-ratón. Una almohadilla conjugada puede estar superpuesta con la membrana en el extremo proximal de la membrana, en la que la almohadilla conjugada comprende el anticuerpo monoclonal MG97, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093, marcado con un grupo informador tal como, por ejemplo, partículas de látex coloreadas. La detección de una banda visible en la zona de ensayo indica la presencia de la proteína Z-AAT en la sangre y la detección de una banda visible en la zona de control confirma que la muestra ha permeado suficientemente a través de la membrana.

En otros aspectos, la presente invención da a conocer un método para determinar un portador del gen PiZ. El método comprende:

(a) someter una muestra a inmunocromatografía utilizando un dispositivo inmunocromatográfico que comprende una membrana que tiene un anticuerpo de captura unido a la misma en una zona de ensayo, en la que el anticuerpo de captura es capaz de unirse con un analito, en el que el analito es una proteína Z-AAT presente en una muestra de un portador del gen PiZ, en el que el anticuerpo de captura es un anticuerpo monoclonal LG96, producido por células de hibridoma depositadas según el nº de Acceso DSM ACC3092; o el anticuerpo monoclonal MG97, producido por células de hibridoma depositadas con el nº de Acceso DSM ACC3093; y en el que el anticuerpo detector es: anticuerpo monoclonal LG96, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092; o anticuerpo monoclonal MG97, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093; y
 (b) determinar la unión del analito al anticuerpo de captura, en el que la unión del analito al anticuerpo de captura indica que el sujeto es un portador de PiZ.

En otras realizaciones, el portador de PiZ tiene un fenotipo que es cualquier combinación alélica que tiene un alelo PiZ.

En algunas realizaciones, el fenotipo es PiZZ, PiMZ, PiSZ, o PiZ/Nulo.

En otra realización, la circulación sanguínea del individuo tiene una concentración de proteína Z-AAT que es detectable y, por lo tanto, indicativa de la existencia del alelo PiZ.

En otras realizaciones, el portador de PiZ es un portador de MZ heterocigótico que tiene un nivel de AAT en suero de, como mínimo, 80 mg/dl, aproximadamente.

En otros aspectos adicionales, la presente invención da a conocer un método para diagnosticar una afección o enfermedad asociada con deficiencia de AAT, método que comprende:

(a) someter una muestra a inmunocromatografía utilizando un dispositivo inmunocromatográfico que comprende una membrana que tiene un anticuerpo de captura unido a la misma en una zona de ensayo, en la que el anticuerpo de captura es capaz de unirse con un analito, y en el que el dispositivo comprende además una estructura conjugada acoplada fluidicamente a la membrana en un extremo próximo, en el que la estructura conjugada comprende un anticuerpo detector que tiene una fracción informante conjugada al mismo en el que el analito es una proteína Z-AAT presente en una muestra de un portador del gen PiZ, en el que el anticuerpo de captura es un anticuerpo monoclonal LG96, producido por células de hibridoma depositadas según el nº de Acceso DSM ACC3092; o el anticuerpo monoclonal MG97, producido por células de hibridoma depositadas con el nº de Acceso DSM ACC3093; y en el que el anticuerpo detector es: anticuerpo monoclonal LG96, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092; o anticuerpo monoclonal MG97, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093; y
 (b) determinar la unión del analito al anticuerpo de captura en el que la unión del analito al anticuerpo de captura indica que el sujeto tiene la afección o la enfermedad.

Dispositivos

En otros aspectos, la presente invención da a conocer un dispositivo para realizar ensayos de unión específica, en particular ensayos inmunocromatográficos tal como se define en las reivindicaciones. Los dispositivos se pueden adaptar fácilmente para utilizar los anticuerpos y métodos de la presente invención para detectar Z-AAT. Entre los dispositivos de ensayo de fase sólida se incluyen, sin que constituyan limitación, dispositivos de inmunocromatografía de inmunoensayo, dispositivos de ensayo dinámico, placas de microtitulación, varillas de inmersión e inmunocapilares.

En una realización preferente, un dispositivo, que puede adaptarse para su utilización con los anticuerpos y métodos de la presente invención, se describe en el documento WO 2010/089102, que da a conocer un dispositivo para líquidos de un cuerpo humano o animal.

En algunas realizaciones, el dispositivo es un sistema cerrado de un solo uso, que tiene un componente de lanceta y un componente de recogida de sangre a través de una interfaz integrada para la determinación capilar directa de una deficiencia de alfa-1-antitripsina.

En una realización, el dispositivo está configurado para realizar un inmunoensayo de tipo sándwich para el antígeno Z-AAT según los métodos de inmunocromatografía y los anticuerpos de la presente invención. La realización de un dispositivo -10-, tal como el que se ilustra en la figura 16 a modo de ejemplo, tiene una carcasa -11- alargada, tubular.

Una tapa -12- está en el interior de la carcasa -11- mirando hacia un lado de un soporte -13- que mantiene un elemento en forma de tira -45-. El elemento en forma de tira -45- se extiende axialmente en la carcasa -11- y se

asienta, en su extremo proximal, en un tubo de entrada en forma de boquilla -44- de un elemento separador en forma de copa -41-. El elemento separador -41-, que separa el área de indicación -40- del área de reacción -30-, tiene una sección transversal en forma de copa, que se abre hacia arriba y se asienta herméticamente con un ajuste apretado en la carcasa -11-. El orificio de paso -42- en la parte inferior del elemento de separación -41- se abre directamente sobre la cara del elemento en forma de tira -45-. El elemento de separación -41- está rodeado por el orificio pasante -42- de los espaciadores -43- (figuras 17 y 19).

En algunas realizaciones, el elemento en forma de tira -45- comprende una membrana (por ejemplo, una pieza de material microporoso absorbente, tal como nitrocelulosa), que opcionalmente puede ser laminado en un soporte (por ejemplo, un soporte de plástico). En contacto con la membrana está: (a) una estructura conjugada que tiene un reactivo de detección, tal como un anticuerpo de detección marcado con un fragmento informador, y (b) una estructura distal, por ejemplo, una tira de un segundo material absorbente (por ejemplo, papel de cromatografía Whatman 3MM, fibra de vidrio), dicha estructura distal está en comunicación de fluido con la membrana a efectos de ayudar en el arrastre de los fluidos de ensayo a través de la membrana desde su extremo proximal hasta el extremo distal. La estructura distal también funciona como un absorbente que absorbe los fluidos que pasan a través de la membrana.

La membrana comprende una zona de ensayo con un anticuerpo de captura según la presente invención inmovilizado sobre la misma. En una realización, la membrana comprende además una zona de control para proporcionar una determinación de que el dispositivo ha funcionado. Preferentemente, la zona de control está ubicada aguas abajo de la zona o zonas de ensayo en las que se determina el resultado del ensayo deseado. Por lo tanto, un informador de control positivo proporciona información de que la muestra ha permeado, como mínimo, la distancia requerida a través de la membrana. Por ejemplo, la zona de control se puede cargar con un anticuerpo u otra molécula/reactivo que se unirá a un reactivo de detección para confirmar que la muestra ha permeado suficientemente a través de la membrana. Por ejemplo, cuando el reactivo de detección es un anticuerpo marcado derivado de un hibridoma murino, la zona de control puede comprender IgG anti-ratón. El anticuerpo de captura en la zona de ensayo es LG96, y/o MG97, el reactivo de detección es LG69 que está marcado con un marcador detectable, y la zona de control comprende IgG anti-ratón inmovilizada sobre la misma. En otra realización, el anticuerpo de captura en la zona de ensayo es LG96 producido por células de hibridoma depositadas con el nº de Acceso DSM ACC3092; o el anticuerpo monoclonal MG97 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093; el reactivo de detección seleccionado entre: anticuerpo monoclonal LG96 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092; o anticuerpo monoclonal MG97 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093, que está marcado con un marcador detectable, y la zona de control comprende IgG anti-ratón inmovilizada sobre la misma.

En algunas realizaciones, se disponen uno o más cartuchos inmediatamente encima del elemento de separación -41- en la dirección axial de la carcasa -11-. En la realización representada en la figura 19A, se muestra el dispositivo comprendiendo tres cartuchos -31-, -34-, y -37- en el área de reacción -30-, y en la realización representada en la figura 19B, se muestra un dispositivo con único cartucho -37-.

A modo de ejemplo, con referencia a la figura 19A, en una realización, cada cartucho -31-, -34-, -37- tiene una parte de carcasa tubular -31a-, -34a-, -37a-, cuyas dimensiones exteriores coinciden con las dimensiones interiores de la carcasa -11-, y está sellada en la parte superior e inferior mediante películas de sellado -32-/33- y -35-/36- y -38-/39-. El o los cartuchos pueden comprender una solución tampón, reactivo u otra sustancia química que se requiera para el ensayo. El o los cartuchos pueden ser prefabricados y utilizados en el estado relleno y sellado con un ajuste apretado en la carcasa -11- de tal manera que las partes de la carcasa tubular se encuentran axialmente la una con la otra. En la realización mostrada en la figura 19A, la región del elemento en forma de tira -45- que mira hacia el cartucho -37- se asienta con su extremo inferior sobre el borde superior del elemento de separación -41-. En el extremo superior opuesto del cartucho -31- existe un elemento de sujeción -15- dispuesto en forma de un manguito de sujeción, que se puede fijar bajo deformación elástica contra la pared interior de la carcasa -11- de tal manera que los uno o más cartuchos están bien posicionados y/o mantenidos los unos contra los otros.

Un dispositivo de corte -19- está dispuesto encima de los cartuchos -31-, -34- y -37-, comprendiendo dicho dispositivo de corte una parte de corte -22-. La parte de corte -22- comprende un cuerpo de retención -21- y una extensión tubular -21b-, que comprende en su extremo inferior mirando hacia el o los cartuchos -31-, -34-, -37- una cuchilla de corte -23-, por ejemplo, una cuchilla que comprende dientes de corte. Dispuesto cerca del extremo inferior de la proyección tubular -21b- está un elemento de sellado -16- anular o cilíndrico, que se asienta sobre el interior de la carcasa -11- y el exterior de la proyección tubular -21b- y está soportado axialmente sobre la parte superior del manguito de sujeción -15-.

El cuerpo de retención -21- de la parte de corte -22- tiene un orificio central axial -21a- en el que se inserta un tubo capilar -24-. Un casquillo tubular -25- tiene un orificio interno ciego -26- en el que se asienta la sección superior que sobresale del tubo capilar -24-. En el extremo superior de la tapa -25- está un soporte -28-, que un usuario puede girar y mover axialmente la tapa -25-. En el extremo inferior, frente al soporte -28- de la tapa -25- está el miembro de guía -27-.

Tal como se muestra en la figura 20, el cuerpo de retención -21- de la parte de corte -22- tiene un pasador de guía -17- que se extiende radialmente hacia fuera que se acopla con una leva formada en la carcasa -11- en forma de una puerta -14- en forma de ranura (véase además la figura 16). Con referencia a la figura 16, la puerta -14- tiene una primera sección -14a- en la dirección circunferencial de la carcasa -11- que delimita una primera sección -14a-, una segunda sección -14b- en una dirección longitudinal de la carcasa -11- que delimita una segunda sección -14b-, una tercera sección -14c- en la dirección circunferencial de carcasa -11- que delimita una tercera sección -14c- y una cuarta sección -14d- en la dirección longitudinal de la carcasa -11- que delimita una cuarta sección -14d-. En algunas realizaciones, puede dotarse de una sección transversal de estrechamiento leve en el extremo -46- en el área de transición entre la tercera sección -14c- y la cuarta sección -14d- con el fin de evitar la transferencia errónea del pasador de guía -17- desde la sección -14c- hasta la sección -14d-. El acoplamiento del pasador de guía -17- en la puerta -14- da lugar al movimiento de la parte de corte -22- con relación a la carcasa -11- y cubre las secciones -14a- y -14c- en las rotaciones, y las secciones -14b- y -14d- en los movimientos axiales.

Para llevar a cabo un ensayo con el dispositivo -10-, la muestra que va a examinarse (por ejemplo, sangre entera) se introduce en la región superior -20-. Por ejemplo, se retira la tapa -25- para exponer una parte del tubo capilar -24-, que se pone en contacto con una gota de sangre, por ejemplo, en la punta del dedo de un individuo. La muestra entra en el tubo capilar -24- por acción capilar. Posteriormente, la tapa -25- se coloca con su orificio ciego -26- sobre el tubo capilar -24- y se desliza completamente de tal manera que se reduce el volumen entre la parte inferior del orificio ciego -26- y el extremo superior del tubo capilar -24-, lo que conduce a un aumento de la presión que hace que la muestra salga del extremo inferior del tubo capilar -24- en el interior -29- de la proyección tubular -21b- de la parte de corte -22-.

Al colocar de nuevo la tapa -25- en el dispositivo, el segmento -27a- de la guía -27- de la tapa -25- se acopla con la entrada -22a- de modo que se lleva a cabo una transmisión de un movimiento de rotación de la tapa -25- sobre la parte de corte -22-. El usuario gira la tapa -25- y, por lo tanto, se hace girar también parte de corte -22- hasta que el pasador de guía -17- se puede mover en la sección -14a-. A continuación, el usuario presiona hacia abajo sobre la tapa -25-, con lo que se presiona también hacia abajo la parte de corte -22- en la dirección axial de la carcasa -11- hasta que el pasador de guía -17- se puede mover en la sección -14b-, como consecuencia de este desplazamiento axial de la parte de corte -22-, la cuchilla de corte -23- entra en contacto con la película de sellado superior -32- del cartucho -31- destruyendo o cortando de este modo la película -32-. Después de la destrucción de la película -32-, la muestra que está presente en el interior -29- de la proyección tubular -21b- entra en contacto con el contenido del cartucho -31-. Los otros cartuchos -34- y -37- están todavía cerrados.

Para iniciar la siguiente fase de ensayo, el usuario gira de nuevo la tapa -25-, con lo que el pasador de guía -17- se mueve a lo largo de la sección -14c- del área de transición entre la sección -14c- y la sección -14d-. En esta posición, es posible para el usuario empujar aún más la tapa -25- en la carcasa -11- de tal manera que la parte de corte -23- se mueve a una distancia suficiente dentro de la carcasa -11- para provocar la destrucción tanto de la película de sellado -33- del cartucho -31- como de la película de sellado -35- del cartucho -34-. Con el fin de destruir/cortar además las películas de sellado -36-, -38- y -39-, la tapa -25- se mueve adicionalmente a una distancia apropiada a lo largo de la sección -14d-. De esta manera, la muestra entra en contacto además sucesivamente con el contenido de los cartuchos -34- y -37-. A continuación, la muestra pasa al interior del separador en forma de copa -41- y fluye a través del orificio pasante -42- para entrar en contacto con el elemento en forma de tira -45- inmediatamente por debajo, en el que puede provocar un cambio de color, que puede ser visualizado a través de una ventana -18-.

En otras realizaciones, el dispositivo comprende además una lanceta -50- en un extremo distal de la carcasa -11- (véase, por ejemplo, las figuras 21-25). Preferentemente, la lanceta es una lanceta desechable.

Con referencia a la figura 21, para realizar el ensayo, se forma una abertura en un tejido corporal en un sitio de muestra mediante el componente de lanceta del dispositivo para obtener una muestra. A continuación, se retira la tapa -25- para dejar al descubierto una parte del tubo capilar -24-, que se pone en contacto con la muestra. A continuación, se coloca de nuevo la tapa -25- en el dispositivo -10- con su orificio ciego -26- sobre el tubo capilar -24- y se desliza completamente de tal manera que se reduce el volumen entre la parte inferior del orificio ciego -26- y el extremo superior del tubo capilar -24-. En una realización, se destruye una película de sellado -32- del cartucho -31- con lo que se permite que la muestra entre en contacto con la solución tampón contenida dentro del cartucho -31- para formar una composición de muestra/solución tampón. A continuación, después de la destrucción de la película de sellado -33-, la composición de muestra/solución tampón entra en contacto con el elemento en forma de tira -45- que, comprende una membrana, una estructura conjugada que tiene un reactivo de detección, en la que el reactivo de detección es un anticuerpo de detección marcado con un fragmento informador, en el que el anticuerpo detector es seleccionado entre: anticuerpo monoclonal LG96 producido por células de hibridoma depositadas con n° de Acceso DSM ACC3092; o anticuerpo monoclonal MG97 producido por células de hibridoma depositadas con n° de Acceso DSM ACC3093; y una estructura distal en comunicación de fluido con la membrana, en la que la composición de muestra/solución tampón entra en contacto con la estructura conjugada de modo que la composición de muestra/solución tampón se absorbe en la misma por capilaridad (efecto mecha), con lo que la composición de muestra/solución tampón entra en contacto con el reactivo de detección. La mezcla de muestra/solución tampón/reactivo de detección se absorbe continuamente por la parte de membrana del elemento

en forma de tira -45- de manera que la mezcla entra en contacto con el anticuerpo de captura seleccionado entre: anticuerpo monoclonal LG96 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092; o anticuerpo monoclonal MG97 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093, e inmovilizado sobre la membrana en la zona de ensayo permitiendo de este modo que cualquier antígeno Z-AAT que pueda estar presente en la mezcla se una al anticuerpo de captura. Opcionalmente, una solución de lavado se puede absorber en el dispositivo después de una cantidad suficiente de tiempo, después de que la mezcla se haya puesto en contacto con el anticuerpo de captura. A continuación, el marcador detectable del anticuerpo de detección se visualiza en el área del anticuerpo de captura inmovilizado. En una realización preferente del dispositivo de ensayo, se incluye un control positivo sobre la membrana en las proximidades del anticuerpo de captura inmovilizado, pero en un lugar diferente, preferentemente inmovilizado sobre la membrana en un área en contacto por el fluido de muestra que migra después de que entre en contacto con el área del anticuerpo de captura inmovilizado.

En algunos aspectos, la presente invención da a conocer un dispositivo de inmunoensayo que comprende: una membrana que tiene un área de captura de la proteína Z-AAT definida por un anticuerpo de captura inmovilizado en la misma, una zona de aplicación de muestra y una trayectoria de flujo desde la zona de aplicación de muestra a la zona de captura de la proteína Z-AAT; y una estructura conjugada situada en la trayectoria de flujo, de manera que la estructura conjugada comprende un reactivo de detección específico para la proteína Z-AAT, siendo el reactivo de detección móvil o movilizable, en el que el anticuerpo de captura es: anticuerpo monoclonal LG96 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092; o anticuerpo monoclonal MG97 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093; y en el que el reactivo de detección es un anticuerpo detector seleccionado entre: anticuerpo monoclonal LG96 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092; o anticuerpo monoclonal MG97 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093.

La presencia o cantidad de una proteína Z-AAT en una muestra de fluido se puede determinar por formación de un complejo entre el anticuerpo de captura y la proteína Z-AAT que puede estar presente en la muestra de fluido.

En otra realización, el anticuerpo de detección está marcado con un fragmento informador.

En otras realizaciones, el anticuerpo de detección es un anticuerpo de detección conjugado con oro.

En aún otras realizaciones adicionales, una fuente de la muestra de fluido es sangre capilar, suero o plasma.

En otros aspectos, la presente invención da a conocer un dispositivo de inmunoensayo para determinar la presencia o cantidad de una proteína Z-AAT en una muestra de fluido. El dispositivo comprende:

un área de aplicación de la muestra;

una membrana microporosa que tiene un área de captura de la proteína Z-AAT definida por un anticuerpo de captura inmovilizado sobre la misma, en la que el anticuerpo de captura es LG96 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092.

una trayectoria de flujo desde el área de aplicación de la muestra hasta el área de captura de la proteína Z-AAT, en la que se puede determinar la presencia o la cantidad de una proteína Z-AAT en una muestra de fluido mediante la formación de un complejo entre el anticuerpo de captura y la proteína Z-AAT que pueda estar presente en la muestra de fluido; y

una estructura conjugada situada en la trayectoria de flujo, en la que la estructura conjugada comprende un reactivo de detección específico para la proteína Z-AAT, siendo el reactivo de detección móvil o movilizable, en la que el reactivo de detección es LG96 conjugado con oro producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092.

En un aspecto, se da a conocer un método para detectar una proteína Z-AAT en un individuo. El método comprende:

aplicar una muestra biológica del individuo al dispositivo de inmunoensayo de la presente invención; y

detectar un complejo que se forma entre el anticuerpo de captura y la proteína Z-AAT que pueda estar presente en la muestra de fluido, en el que la detección del complejo indica la presencia de la proteína Z-AAT en la muestra.

Kits

En un aspecto, la presente invención da a conocer un método para determinar la predisposición de un individuo a desarrollar una afección o enfermedad asociada con la deficiencia de AAT, comprendiendo el método:

(a) someter una muestra a inmunocromatografía utilizando un dispositivo inmunocromatográfico que comprende una membrana que tiene un anticuerpo de captura unido a la misma en una zona de ensayo, en el que el anticuerpo de captura es capaz de unirse con un analito, y en el que el dispositivo comprende además una estructura conjugada fluidicamente acoplada a la membrana en un extremo próximo, de manera que la estructura conjugada comprende un anticuerpo detector que tiene una fracción informadora conjugada

al mismo en el que el analito es una proteína Z-AAT presente en una muestra de un portador del gen PiZ, en el que el anticuerpo de captura es: anticuerpo monoclonal LG96, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092; o anticuerpo monoclonal MG97, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093; y en el que el anticuerpo detector es: anticuerpo monoclonal LG96, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092, o anticuerpo monoclonal MG97, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093; y

(b) determinar una señal en la zona de ensayo, en la que la presencia de una señal en la zona de ensayo es indicativa de la predisposición del individuo a desarrollar la afección o enfermedad.

La presente invención, en otros aspectos, da a conocer un kit que comprende:

- (a) un dispositivo inmunocromatográfico según la presente invención; y
- (b) un anticuerpo de detección que tiene un fragmento informador conjugado al mismo.

En una realización, el anticuerpo de detección es el anticuerpo monoclonal LG96 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092; o MG97 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093, en el que el anticuerpo está marcado con un fragmento informador.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer un kit que comprende el anticuerpo monoclonal LG96 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092, MG97 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093, o ambos.

En otros aspectos, el dispositivo y los reactivos para llevar a cabo el inmunoensayo se pueden ser envasar en forma de un kit. Por ejemplo, dicho kit puede incluir un dispositivo de ensayo apropiado, reactivos de anticuerpos y/o reactivos para el desarrollo del ensayo, tales como soluciones tampón y/o reactivos para la detección del marcador elegido, si es necesario.

En algunos aspectos, la presente invención da a conocer un kit para determinar la presencia de una proteína Z-AAT en una muestra biológica de un individuo, comprendiendo dicho kit un dispositivo tal como el que se describe en la presente memoria descriptiva, opcionalmente con reactivos y/o instrucciones de utilización.

En otras realizaciones, el kit puede incluir además opcionalmente otros materiales/componentes deseables desde un punto de vista comercial y del usuario final, entre los que incluyen lancetas, soluciones tampón (por ejemplo, Solución Tampón de Muestra, CANDOR Bioscience GmbH, Wangen, Alemania), diluyentes, filtros, capilares (por ejemplo, capilar de 20 µl), agujas y/o jeringas, por ejemplo para recoger/obtener una muestra biológica.

En otras realizaciones adicionales, el kit puede incluir además un sistema que permite la detección de los resultados del ensayo. Los resultados se pueden detectar visualmente o instrumentalmente dependiendo de la marca presente en los complejos. En una realización preferente, los resultados se detectan visualmente.

Anticuerpos monoclonales

En otra realización, la presente invención da a conocer el anticuerpo monoclonal LG96 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092; y el anticuerpo monoclonal MG97 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Anticuerpos monoclonales

Se prepararon los hibridomas LG96 y MG97 por inmunización de ratones BALB/c con alfa-1-antitripsina (AAT) polimérica humana en Adyuvante de Freud completo. Los ratones se inmunizaron intra-peritonealmente; los intervalos entre las inmunizaciones fueron de 7-8 días. Las células de bazo de los ratones inmunizados se fusionaron con la línea celular de plasmacitoma de NSW. Los sobrenadantes de hibridoma se cribaron frente a la presencia de anticuerpos monoclonales mediante ELISA utilizando placas de microtitulación recubiertas con hAAT polimérica o suero de pacientes PiZZ con deficiencia de AAT.

Los hibridomas seleccionados se clonaron y se cribaron de nuevo para seleccionar aquellos que producen anticuerpos contra la AAT polimérica pero no contra la AAT nativa. Los anticuerpos monoclonales de hibridomas LG96 y MG97 parecían reconocer la AAT polimérica y reaccionaron específicamente con suero PiZ.

Los hibridomas se congelaron en medio específico (DMEM con 20% de FCS y 10% DMSO) la concentración de células en cada vial fue 2×10^6 células/ml. Las células se mantuvieron en atmósfera de nitrógeno. Las células pueden ser recuperadas utilizando medio DMEM-10 o 20% de suero.

5 Ejemplo 2

Ensayos de anticuerpos LG96 y MG97 contra la AAT de tipo PiZZ

10 Los anticuerpos monoclonales LG96 y MG97 fueron evaluados por su capacidad para unirse al tipo PiZZ nativo en un ELISA tipo sándwich. Se obtuvieron pequeñas cantidades de sobrenadantes de cultivos celulares que comprenden los anticuerpos y se purificaron parcialmente ambos anticuerpos por CANDOR Bioscience GmbH (Wangen, Alemania).

Ensayo ELISA tipo sándwich por parejas coincidentes,

15 Todas las soluciones tampón utilizadas para los inmunoensayos fueron proporcionadas por CANDOR Bioscience. La placa de microtitulación (MaxiSorp®, Nunc, Langensfeld, Alemania) se recubrió con anticuerpos LG96 o MG97 parcialmente purificados, respectivamente, mediante la adición de 150 µl del correspondiente anticuerpo de captura a 1 µg/ml en solución tampón de recubrimiento de pH 9,6 (número de producto 121) a cada uno y se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente en condiciones de agitación. Después de retirar la solución de recubrimiento, las placas se bloquearon añadiendo 300 µl de solución de bloqueo (número de producto 110) a cada pocillo y se incubaron durante toda la noche a 4°C. La placa se lavó tres veces con solución tampón de lavado (número de producto 140). A continuación, los sueros humanos (suero-ZZ- o suero-MM genotipado mezclado) se diluyeron con solución tampón de muestra (número de producto 105) 1:20 y 1:80 (5% y 1,25% de suero) que contenía 1 g/ml de LG96HRP o MG97HRP, respectivamente. La solución tampón de muestra sin suero actuó como control negativo (0%). Se añadieron 150 µl de estas mezclas a cada pocillo y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente en condiciones de agitación. Después de la etapa de incubación, la placa se lavó tres veces. A continuación se añadieron 150 µl de solución de TMB (Kem-En-Tec, Dinamarca) a cada pocillo y se incubaron durante 15 min. La reacción se detuvo con la adición de 50 µl de H₂SO₄ 2 N. Se determinó la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de microplacas.

Ensayos de reactividades cruzadas

35 Se recubrió la placa de microtitulación (MaxiSorp®, Nunc) con AAT purificada (BA672 forma M, Acris GmbH, Alemania) mediante la adición de 150 µl de AAT a 1 g/ml en solución tampón de recubrimiento de pH 7,4 (número de producto 120) a cada pocillo y se incubó durante 6 horas a temperatura ambiente en condiciones de agitación. Después de eliminar la solución de recubrimiento, las placas se bloquearon mediante la adición de 250 µl de solución de bloqueo (número de producto 110) a cada pocillo y se incubaron durante la noche a 4°C. La placa se lavó cuatro veces con solución tampón de lavado (número de producto 140). Posteriormente, los anticuerpos Z-específicos LG96 y MG97 purificados, y los anticuerpos F43.8.1 disponibles comercialmente (Monosan®, Uden, Países Bajos) y 1AT (Acris Antibodies GmbH, Herferd, Alemania), ambos dirigidos contra la forma M, se diluyeron en serie con solución tampón de muestra (número de producto 105) para producir diferentes concentraciones de ensayo de cada anticuerpo (1.000 ng/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 1,25 ng/ml, 0,625 ng/ml y 0 ng/ml). Se añadieron 150 µl de cada anticuerpo diluido en serie a los pocillos y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente en condiciones de agitación. Después de la etapa de incubación la placa se lavó cuatro veces. Para la detección, se utilizó un anticuerpo secundario marcado con HRP (IgG anti-ratón-HRP 610-703-124, Biotrend, Alemania), que se diluyó con solución tampón de muestra a 0,5 g/ml y se añadió a cada pocillo seguido de una etapa de incubación de 2 h aproximadamente a temperatura ambiente en condiciones de agitación. Posteriormente, se lavó la placa cuatro veces. A continuación, se añadieron 150 µl de una solución de TMB (Kem-En-Tec, Dinamarca) a cada pocillo y se incubaron durante 26 min. La reacción se detuvo con la adición de 50 µl de H₂SO₄ 2 N. Se determinó la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de microplacas.

55 Los resultados se muestran en las figuras 1 y 2. La figura 1 muestra un ELISA tipo sándwich (ensayo por parejas coincidentes) en el que ambos anticuerpos se utilizaron bien como anticuerpos de captura o bien como anticuerpos de detección, estos últimos marcados con peroxidasa de rábano picante (HRP). Se utilizaron una mezcla de sueros humanos de 10 pacientes portadores de AAT ya sea de tipo PiZZ o PiMM (genotipo no mostrado) como solución de antígeno. Utilizando anticuerpos parcialmente purificados, se observó una unión específica positiva a la mezcla de sueros tipo PiZZ y no se observó reactividad cruzada con la mezcla de suero tipo PiMM.

60 Los resultados de un ensayo adicional para las reactividades cruzadas se muestran en la figura 2. En éste, la forma M de AAT purificada se recubrió en pocillos de ELISA y se determinó la unión de los anticuerpos LG96 y MG97 nativos. A diferencia de la unión específica de los anticuerpos de control M-específicos 1AT y F43.8.1 frente a AAT de tipo M recubierta, los anticuerpos LG96 y MG97 no muestran reactividad cruzada con la AAT de tipo M.

65 Los resultados muestran que los anticuerpos monoclonales LG96 y MG97 pueden ser utilizados con éxito en un ELISA tipo sándwich contra AAT de tipo PiZZ. Los anticuerpos monoclonales LG96 y MG97 se pueden utilizar como

anticuerpos de ensayo en un inmunoensayo de formato sándwich específico para la AAT de tipo PiZZ sin reactividades cruzadas con el tipo PiMM.

Ejemplo 3

Desarrollo de un ELISA para Z-AAT de referencia

Se cribaron diez muestras (ensayos en blanco) de individuos diferentes (P1-P10) frente a la existencia de Z-AAT con una relación de aciertos del 100% (figura 13). Se indicaron todas las muestras con Z, y no se indicaron las que no tienen Z (tales como MM).

Ejemplo 4

Ensayos adicionales de ELISA

Se utilizaron muestras de suero de un paciente ZZ (suero #1 y 2), de un paciente MZ que está siendo sustituida con Prolastin® (suero #3 y 4), y de una persona de control (MM; suero #5+6). Se midieron las muestras de suero 1-6 (descritas anteriormente). Se utilizó como estándar el suero #1 con una concentración conocida de 36 mg/dl (determinada por nefelometría). La concentración de las muestras de suero #2-6 se determinó en el ensayo ELISA (Tabla 1).

Tabla 1: Concentración de proteína-Z en las muestras de suero 1-6.

	Suero #1 (PiZZ)	Suero #2 (PiZZ)	Suero #3 (MZ)	Suero #4 (MZ)	Suero #5 (PiMM)	Suero #6 (PiMM)
Concentración de proteína-Z [mg/dl]	36,0	34,0	35,8	34,1	0,0	0,0

Se confirmó la especificidad de los anticuerpos MG97 y LG96. Las muestras de suero #5 y 6 fueron claramente negativas, pero las muestras de suero #1-4 mostraron una fuerte señal positiva. Se ensayaron en su contenido en AAT-Z diferentes preparaciones de suero y plasma, disponibles comercialmente preparadas internamente (figura 14). Las muestras de suero/plasma disponibles comercialmente, así como las muestras internas, se pueden utilizar como muestras negativas.

Marcaje de anticuerpos

Se acopló tanto el anticuerpo MG97 como el LG96 con éxito a partículas de oro coloidal de 40 nm.

Combinación de anticuerpos

Los anticuerpos se utilizaron como anticuerpo de captura, así también como anticuerpo de detección en cada combinación posible. Las muestras de suero #1-6 se utilizaron para la detección de anticuerpos (figuras 15A-15D).

Conclusión

Se identificaron las combinaciones MG97/LG96 y LG96/LG96 (anticuerpo de captura/anticuerpo de detección) como las mejores en términos de diferenciación entre muestras positivas (#1-4) y muestras negativas (#5 y 6). La combinación LG96/LG96 puede ser preferente debido a que los resultados de #1+2, 3+4 y 5+6 fueron más semejantes.

Ejemplo 5

Dispositivo de ensayo

Se probó el suero ZZ(+) en tres dispositivos separados, tal como se muestra en la figura 26. Todos los ensayos fueron positivos.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para inmunoensayo que comprende:

- 5 - una membrana que tiene una zona de captura de proteína Z-AAT definida por un anticuerpo de captura inmovilizado en la misma;
 - una zona de aplicación de muestra y una trayectoria de flujo desde la zona de aplicación de muestra a la zona de captura de proteína Z-AAT;
 y
 10 - una estructura conjugada situada en la trayectoria de flujo, cuya estructura conjugada comprende un reactivo de detección específico para la proteína Z-AAT, siendo el reactivo de detección móvil o movilizable,

en el que el anticuerpo de captura es:

- 15 el anticuerpo monoclonal LG96 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092; o el anticuerpo monoclonal MG97 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093; y

en el que el reactivo de detección es un anticuerpo detector seleccionado entre:

- 20 anticuerpo monoclonal LG96 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092; o bien anticuerpo monoclonal MG97 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093.

- 25 2. Dispositivo, según la reivindicación 1, en el que la presencia o cantidad de una proteína Z-AAT en una muestra de fluido se puede determinar por formación de un complejo entre el anticuerpo de captura y la proteína Z-AAT que puede encontrarse presente en la muestra de fluido.

3. Dispositivo, según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo de captura es el anticuerpo monoclonal LG96 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092 y el anticuerpo detector es el anticuerpo monoclonal LG96 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092.

- 30 4. Dispositivo, según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo de captura es el anticuerpo monoclonal LG96 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092 y el anticuerpo detector es el anticuerpo monoclonal MG97 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093.

- 35 5. Dispositivo, según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo de captura es el anticuerpo monoclonal MG97 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093 y el anticuerpo de detección es el anticuerpo monoclonal LG96 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092.

- 40 6. Dispositivo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo detector está marcado con una fracción informadora.

7. Dispositivo, según la reivindicación 6, en el que el anticuerpo detector es un anticuerpo detector conjugado de oro.

- 45 8. Dispositivo, según la reivindicación 2, en el que una fuente de muestra de fluido es sangre capilar, suero o plasma.

9. Dispositivo, según la reivindicación 1, en el que dicho dispositivo de inmunoensayo es un dispositivo inmunocromatográfico que comprende una membrana que tiene un anticuerpo de captura unido a la misma en una zona de prueba, en el que el anticuerpo de captura es capaz de unirse con un analito y en el que el dispositivo comprende además una estructura conjugada acoplada fluidicamente a la membrana en un extremo próximo, de manera que la estructura conjugada comprende un anticuerpo detector que tiene una fracción informadora conjugada a la misma de manera que el analito es una proteína Z-AAT presente en una muestra de un portador de gen PiZ, en el que el anticuerpo de captura es:

- 50 anticuerpo monoclonal LG96, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092; o anticuerpo monoclonal MG97, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093; y en el que el anticuerpo detector es:

- 60 anticuerpo monoclonal LG96, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092; o anticuerpo monoclonal MG97, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093.

10. Dispositivo, según la reivindicación 9, en el que el anticuerpo de captura es el anticuerpo monoclonal MG97, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093, y el anticuerpo detector es el anticuerpo monoclonal LG96, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092.

- 65

11. Dispositivo, según la reivindicación 9, en el que el anticuerpo de captura es el anticuerpo monoclonal LG96, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092, y el anticuerpo detector es el anticuerpo monoclonal LG96, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092.
- 5 12. Dispositivo, según la reivindicación 9, en el que el anticuerpo de captura es el anticuerpo monoclonal LG96, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092, y el anticuerpo detector es el anticuerpo monoclonal MG97, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093.
- 10 13. Dispositivo, según la reivindicación 9, en el que la estructura conjugada es una almohadilla conjugada que se superpone parcialmente con la membrana en el extremo próximo de la membrana.
14. Dispositivo, según la reivindicación 9, que comprende además un sistema separador de sangre para recibir la muestra, en el que el sistema de separación de la sangre está acoplado fluidicamente a la estructura conjugada.
- 15 15. Dispositivo, según la reivindicación 14, en el que el sistema de separación de sangre se superpone parcialmente a la almohadilla conjugada.
- 20 16. Dispositivo, según la reivindicación 14, que comprende además una estructura distal acoplada fluidicamente a la membrana en un extremo distal de la misma, de manera que la estructura distal está configurada para proporcionar suficiente paso de la muestra desde el extremo próximo al extremo distal de la membrana.
- 25 17. Dispositivo, según la reivindicación 16, en el que la estructura distal es una almohadilla absorbente configurada para proporcionar suficiente flujo de la muestra desde el extremo próximo de la membrana hasta, como mínimo, una zona de control por acción capilar.
- 30 18. Dispositivo, según la reivindicación 9, en el que la membrana comprende además una zona de control que tiene un anticuerpo de control unido a la misma, de manera que el anticuerpo de control es capaz de unirse con un reactivo de detección.
- 35 19. Dispositivo, según la reivindicación 18, en el que el anticuerpo de control es un IgG anti-ratón.
20. Procedimiento para determinar un portador de gen PiZ, cuyo procedimiento comprende:
someter una muestra de un sujeto a inmunocromatografía utilizando el dispositivo de la reivindicación 9; y
determinar la unión del analito al anticuerpo de captura, de manera que la unión del analito al anticuerpo de captura indica que el sujeto es un portador de PiZ.
- 40 21. Procedimiento, según la reivindicación 20, en el que el portador de PiZ tiene un fenotipo que es una combinación alélica que tiene un alelo PiZ.
- 45 22. Procedimiento, según la reivindicación 20, en el que el anticuerpo de captura es el anticuerpo monoclonal MG97, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093, y el anticuerpo detector es el anticuerpo monoclonal LG96, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092.
- 50 23. Procedimiento, según la reivindicación 20, en el que el anticuerpo de captura es el anticuerpo monoclonal LG96, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092, y el anticuerpo detector es el anticuerpo monoclonal LG96, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092.
24. Procedimiento, según la reivindicación 20, en el que el anticuerpo de captura es el anticuerpo monoclonal LG96, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092, y el anticuerpo detector es el anticuerpo monoclonal MG97, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093.
- 55 25. Procedimiento, según la reivindicación 21, en el que el fenotipo es PiZZ, PiMZ, PiSZ, o PiZ/nulo.
26. Procedimiento para diagnosticar un estado o enfermedad asociada con deficiencia de AAT, cuyo procedimiento comprende:
someter una muestra del sujeto a inmunocromatografía utilizando el dispositivo de la reivindicación 9; y
determinar la unión del analito al anticuerpo de captura, de manera que la unión del analito al anticuerpo de captura indica que el sujeto tiene dicho estado o enfermedad.
- 60 27. Procedimiento para determinar la predisposición de un sujeto en desarrollar un estado o enfermedad asociado con deficiencia de AAT, cuyo procedimiento comprende:
someter una muestra del sujeto a inmunocromatografía utilizando el dispositivo de la reivindicación 9; y
determinar la unión del analito al anticuerpo de captura, de manera que la unión del analito al anticuerpo de captura

es indicativa de la predisposición del sujeto a desarrollar dicho estado o enfermedad.

28. Dispositivo, según la reivindicación 1, en el que dicho dispositivo comprende:

- 5 una zona de aplicación de la muestra;
- una membrana microporosa que tiene una zona de captura de proteína Z-AAT definida por un anticuerpo de captura inmovilizado a la misma, en el que el anticuerpo de captura es LG96, producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092;
- 10 una trayectoria de flujo desde la zona de aplicación de la muestra a la zona de captura de la proteína Z-AAT, de manera que la presencia o cantidad de la proteína Z-AAT en una muestra de fluido se puede determinar por formación de un complejo entre el anticuerpo de captura y la proteína Z-AAT que puede encontrarse presente en la muestra de fluido; y
- una estructura conjugada situada en la trayectoria de flujo, de manera que la estructura conjugada comprende un reactivo de detección específico para la proteína Z-AAT, siendo el reactivo de detección móvil o movilizable, de
- 15 manera que el reactivo de detección es LG96 conjugado de oro, producido por células de hibridoma depositadas con el nº de Acceso DSM ACC3092.

29. Procedimiento, según la reivindicación 20, en el que dicho procedimiento comprende:

- 20 aplicar una muestra biológica del sujeto al dispositivo de inmunoensayo de la reivindicación 28; y
- detectar un complejo que se forma entre el anticuerpo de captura y la proteína Z-AAT que puede encontrarse presente en la muestra de fluido, en el que la detección del complejo indica la presencia de la proteína Z-AAT en la muestra.
- 25 30. Kit que comprende:
 - (a) el dispositivo de la reivindicación 9; y
 - (b) un anticuerpo detector que tiene una fracción informadora conjugada al mismo
- 30 31. Anticuerpo monoclonal LG96 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3092.
- 32. Anticuerpo monoclonal MG97 producido por células de hibridoma depositadas con nº de Acceso DSM ACC3093.

35

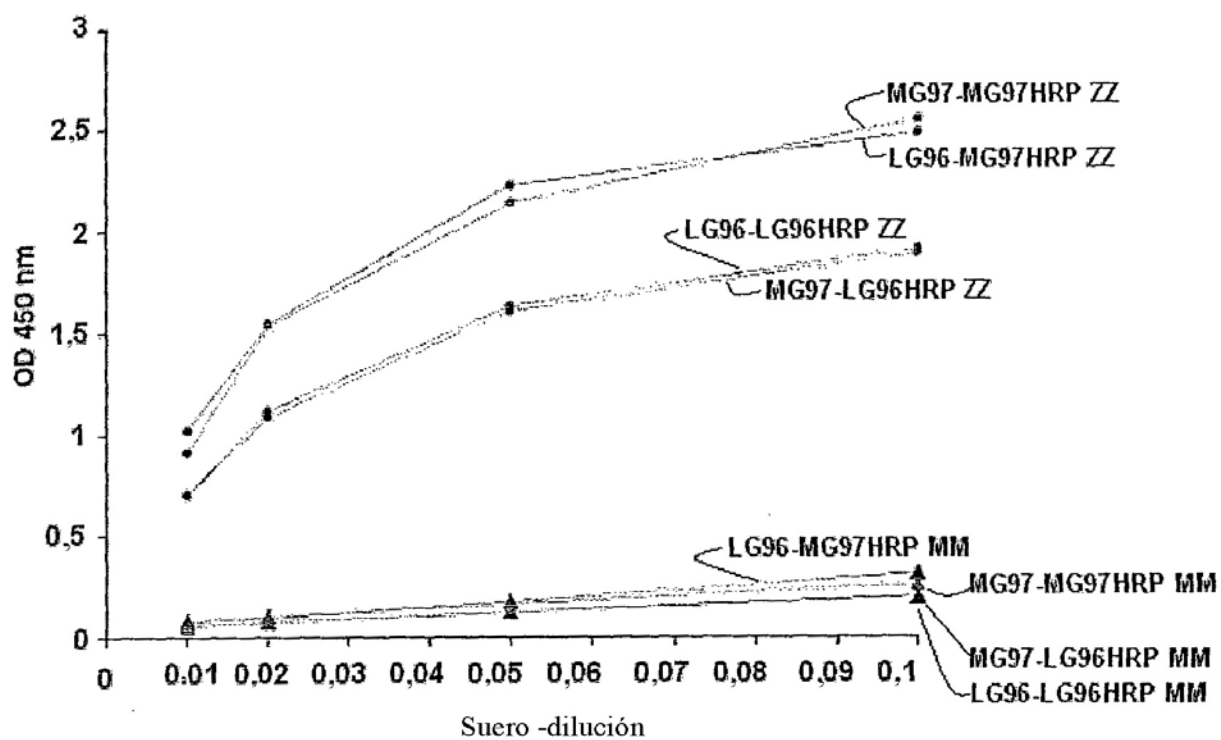


FIG. 1

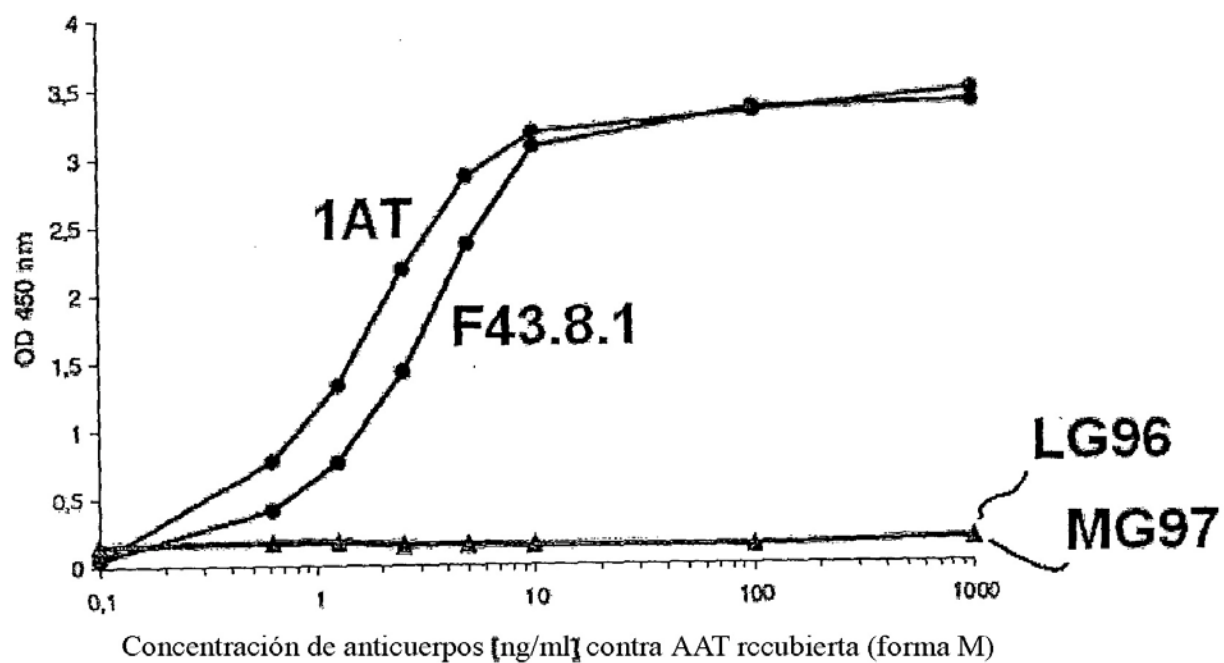


FIG. 2

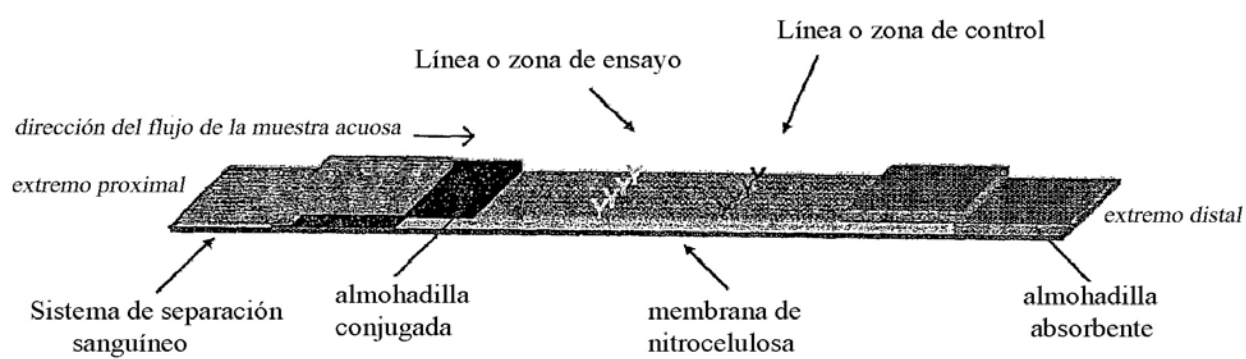


FIG. 3

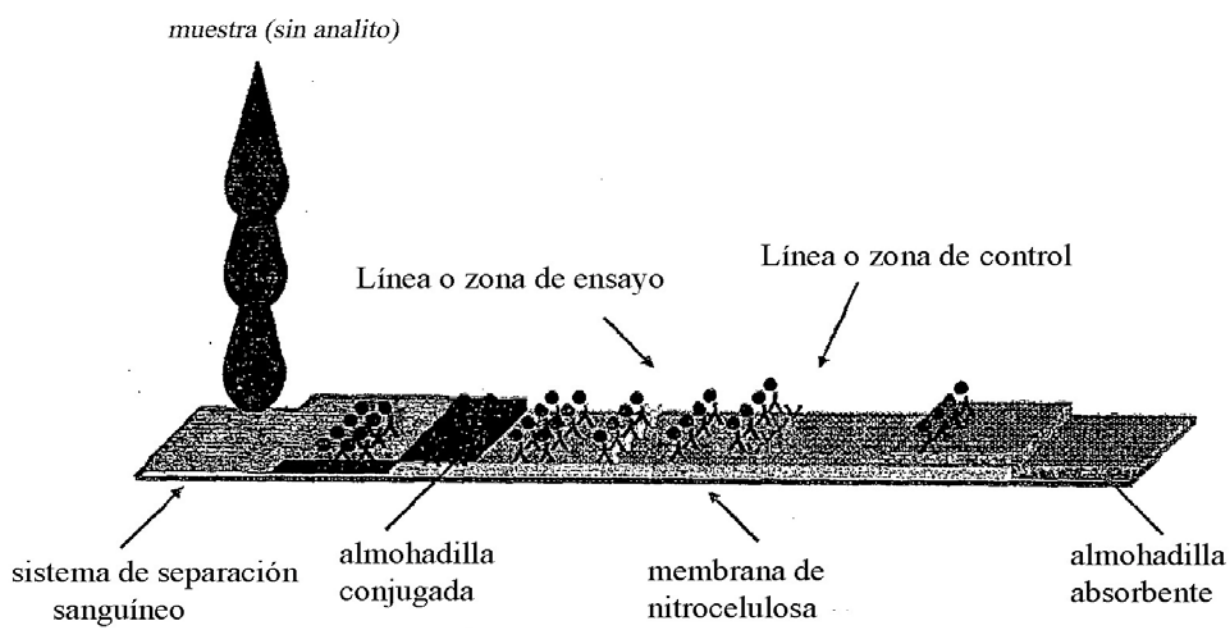


FIG. 4

sin analito presente en la muestra

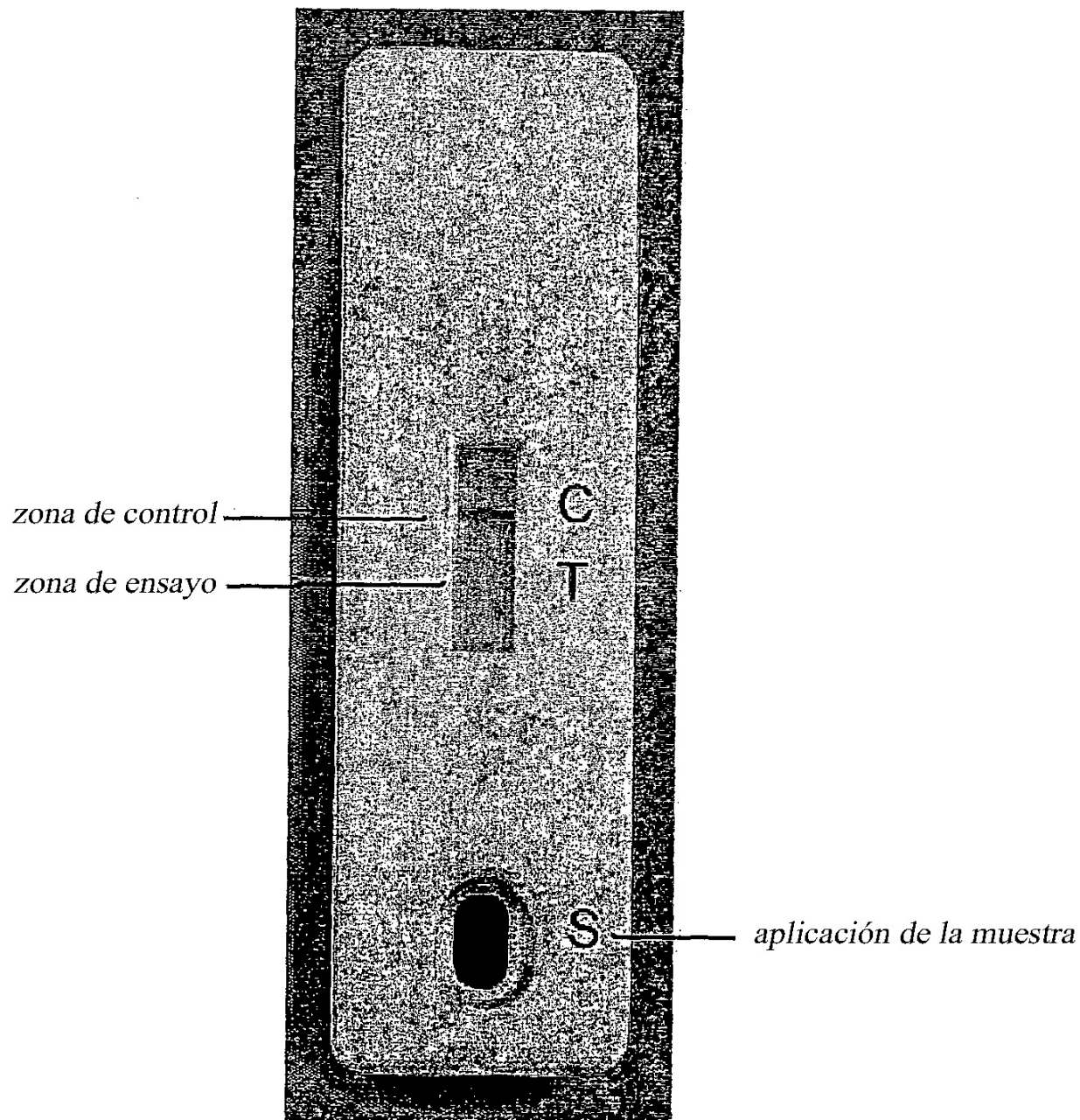


FIG. 5

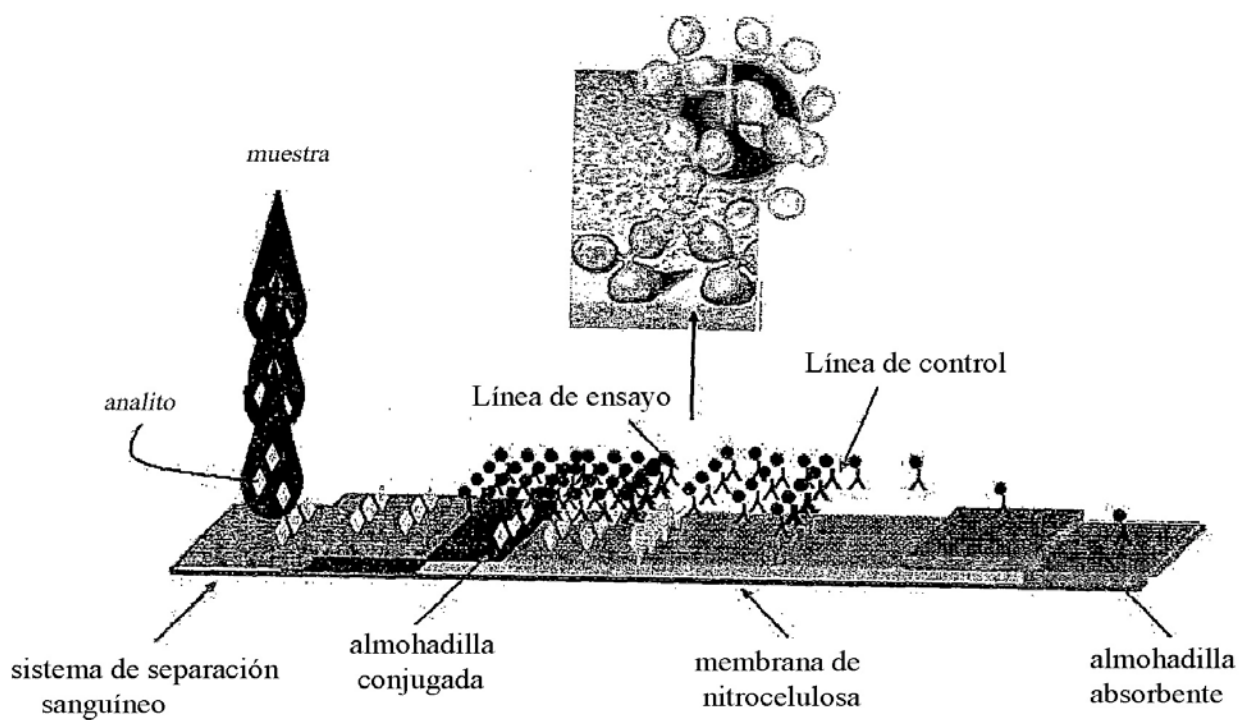


FIG. 6

Analito presente en la muestra

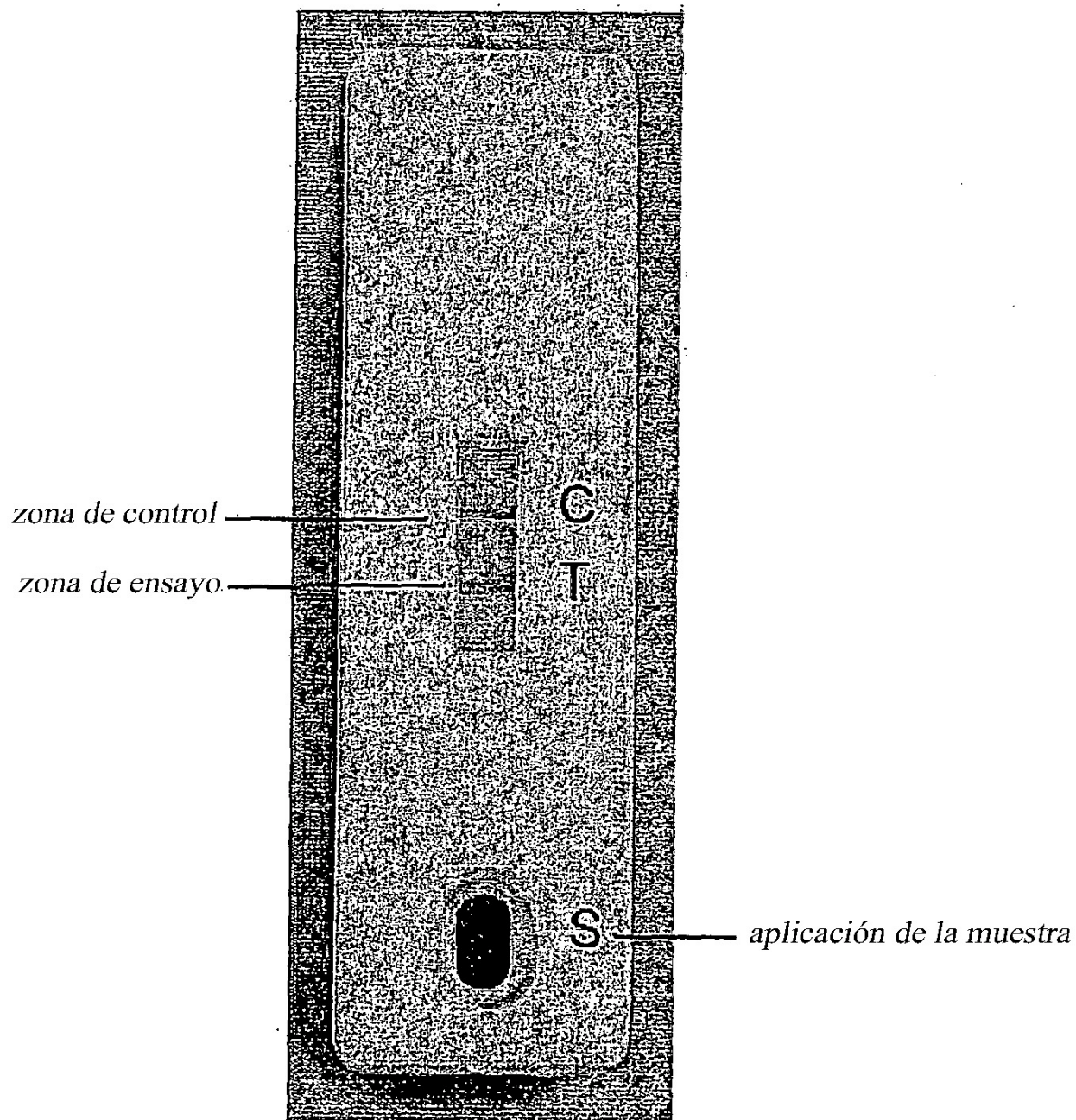


FIG. 7

Detección de Z positiva - Control positivo

Muestra de sangre del paciente: tipo ZZ

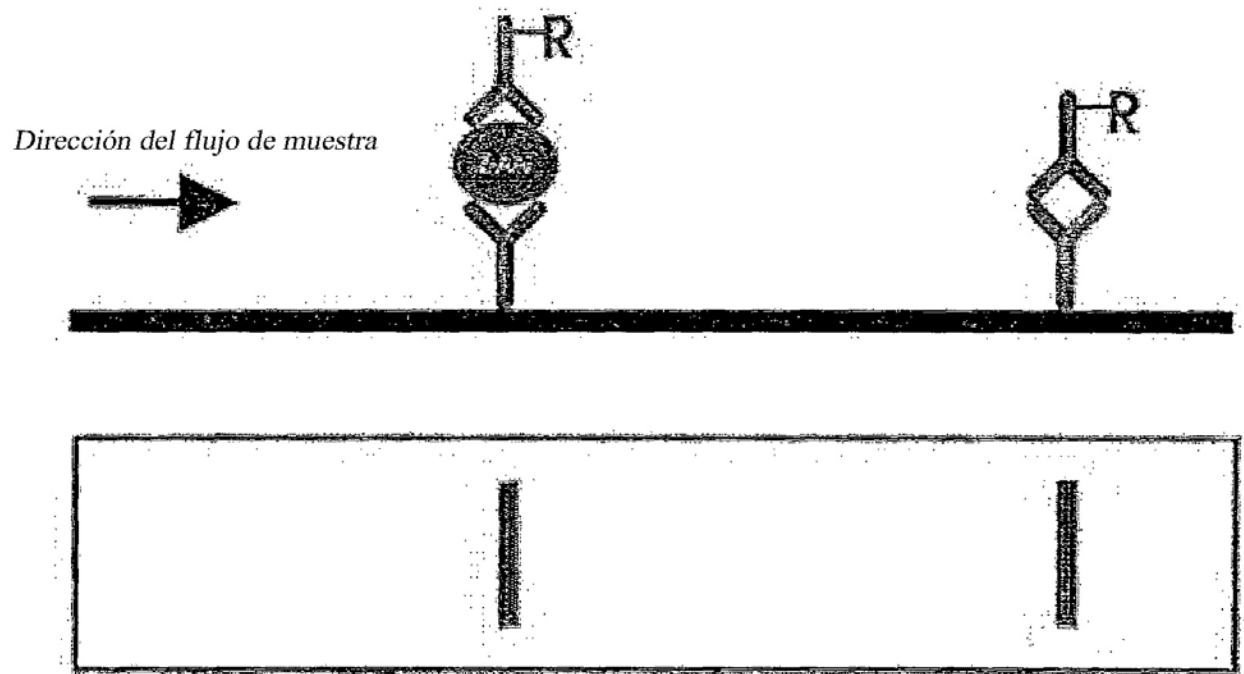


FIG. 8

Detección de Z negativa - Control positivo

Muestra de sangre del paciente: tipo MM

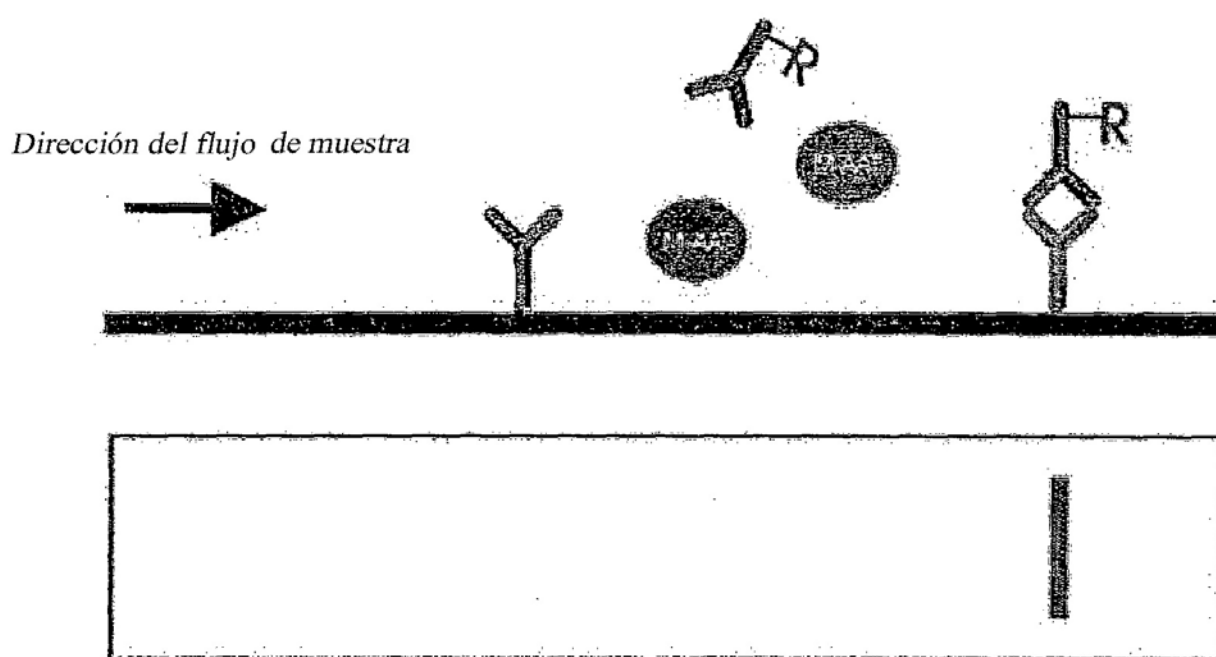


FIG. 9

Detección de Z positiva - Control positivo

Muestra de sangre del paciente: Tipo MZ

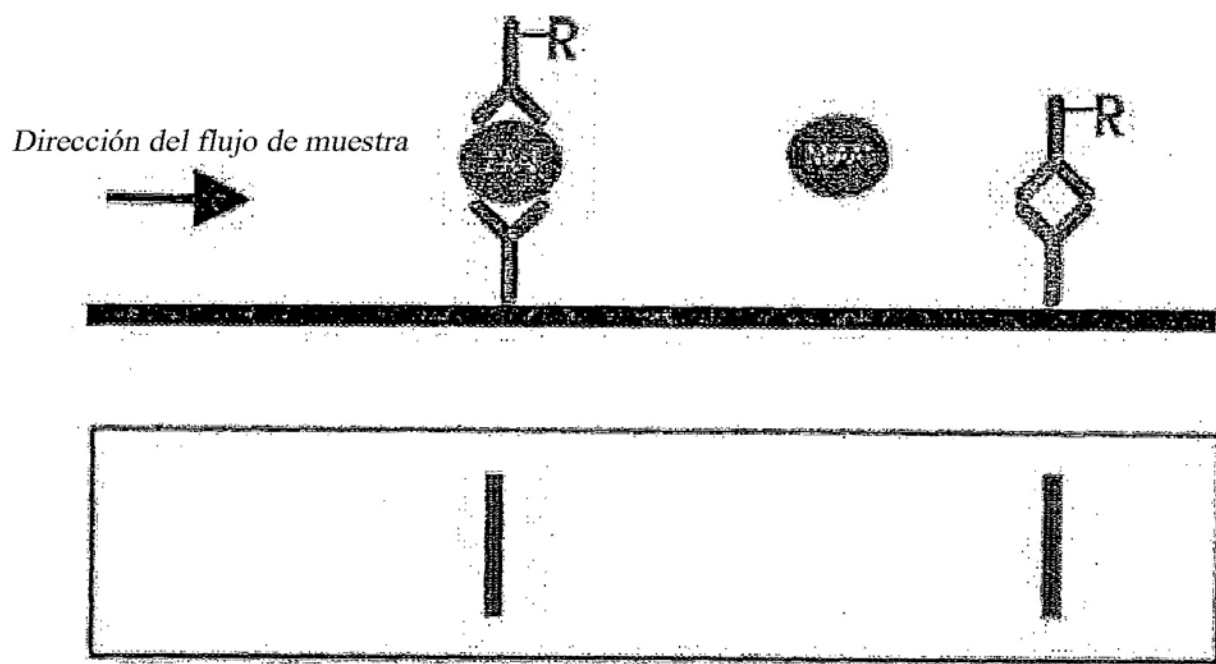
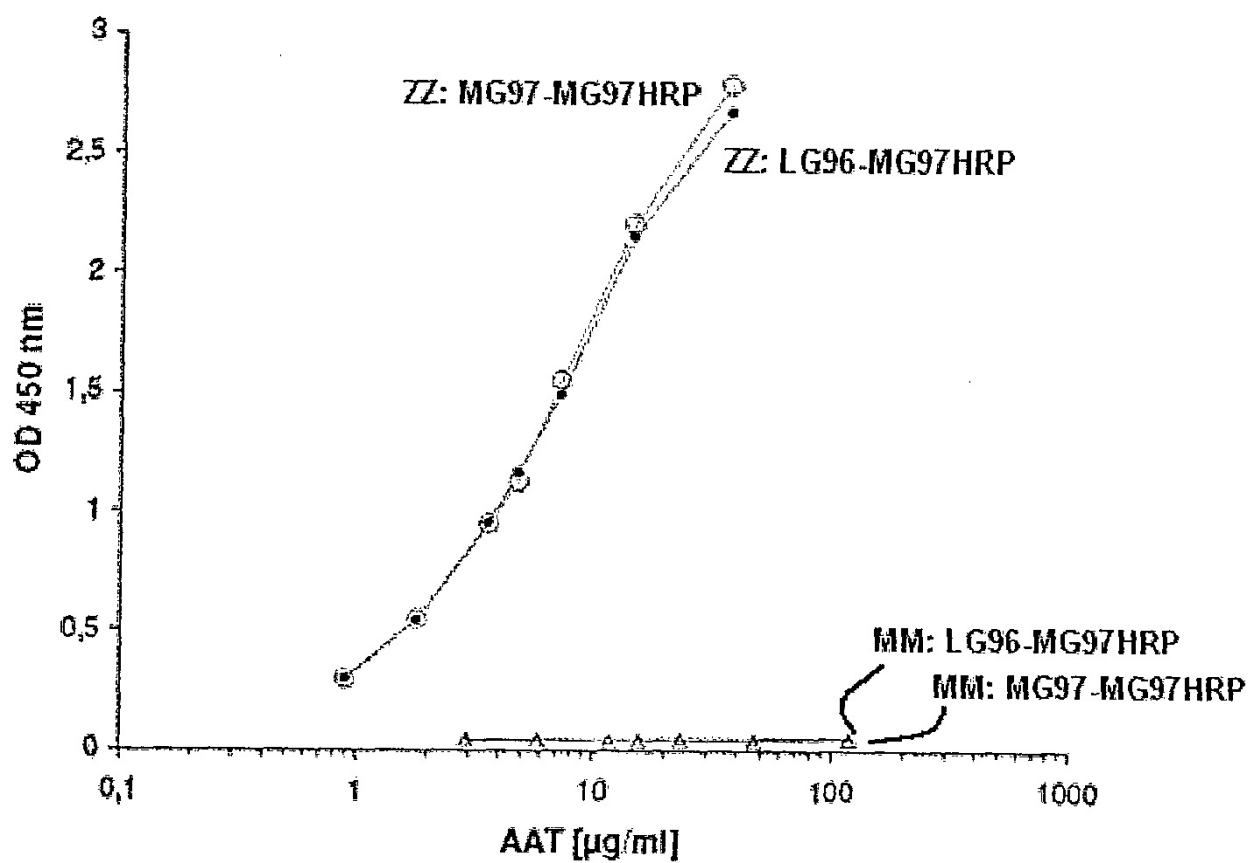


FIG. 10

**FIG. 11**

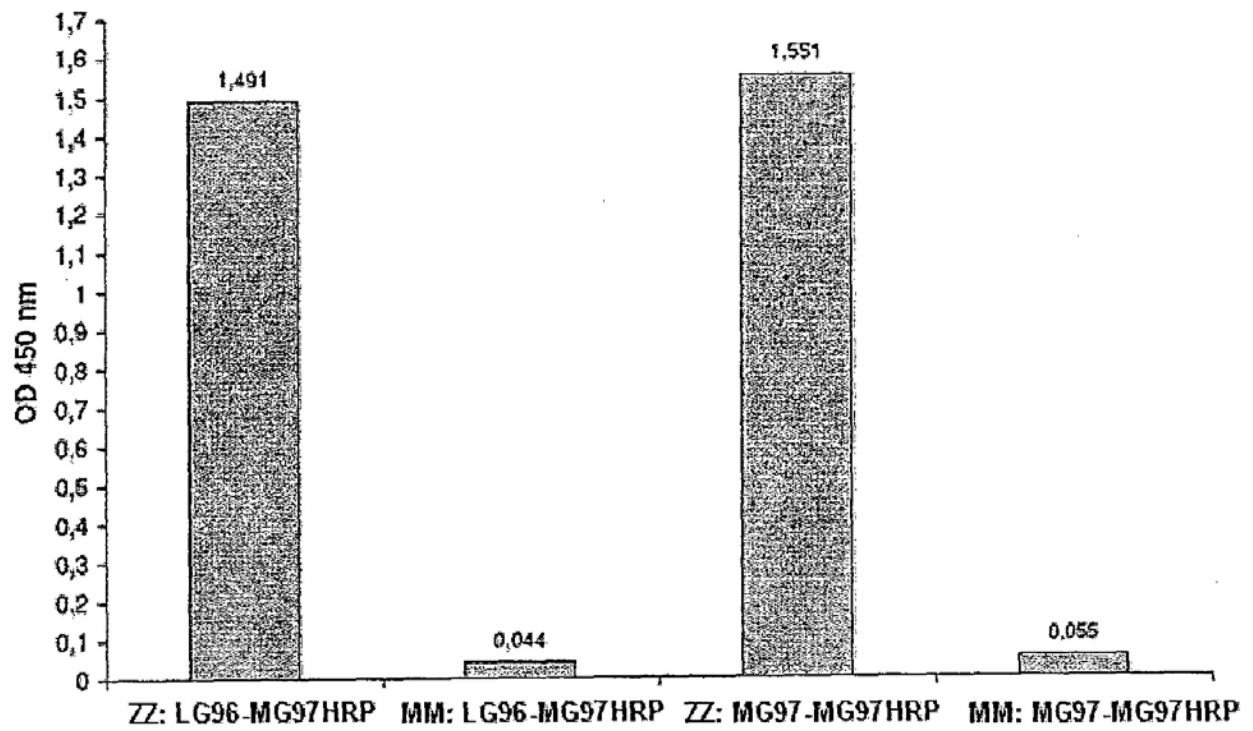
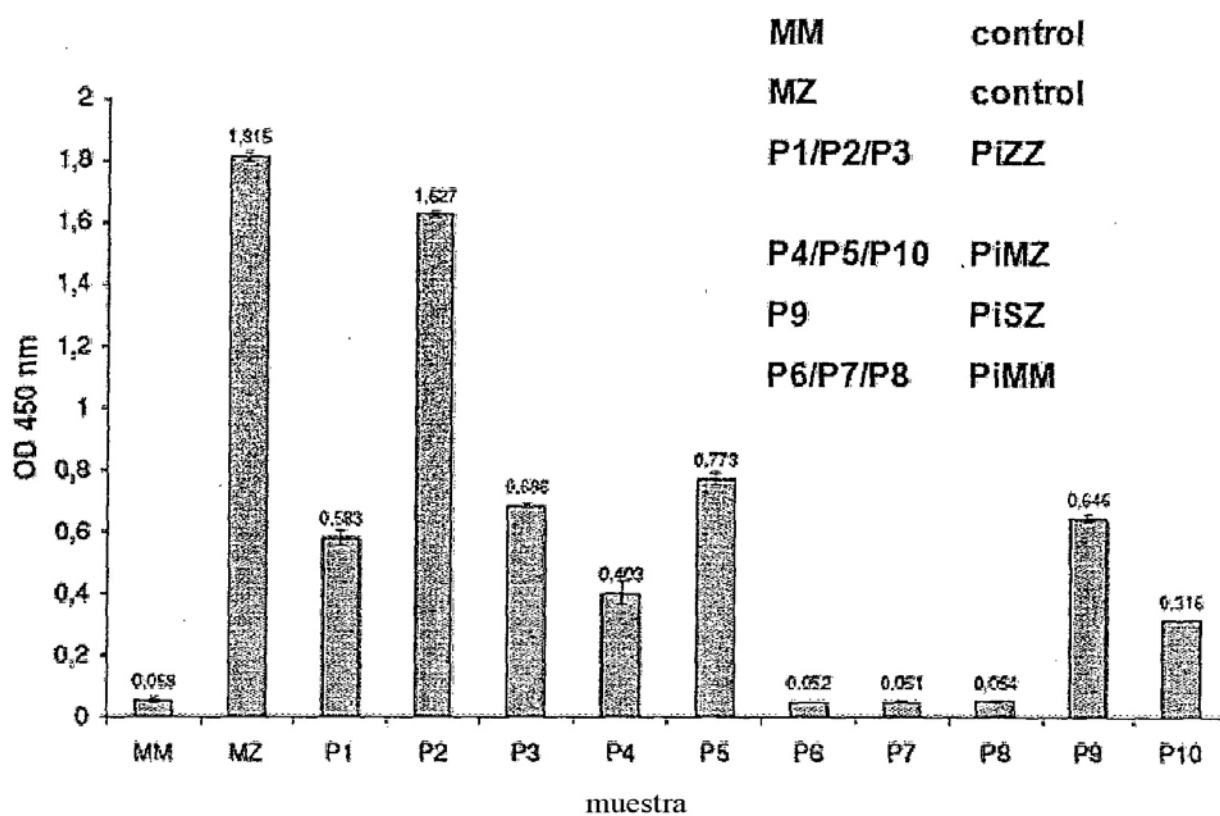


FIG. 12

**FIG. 13**

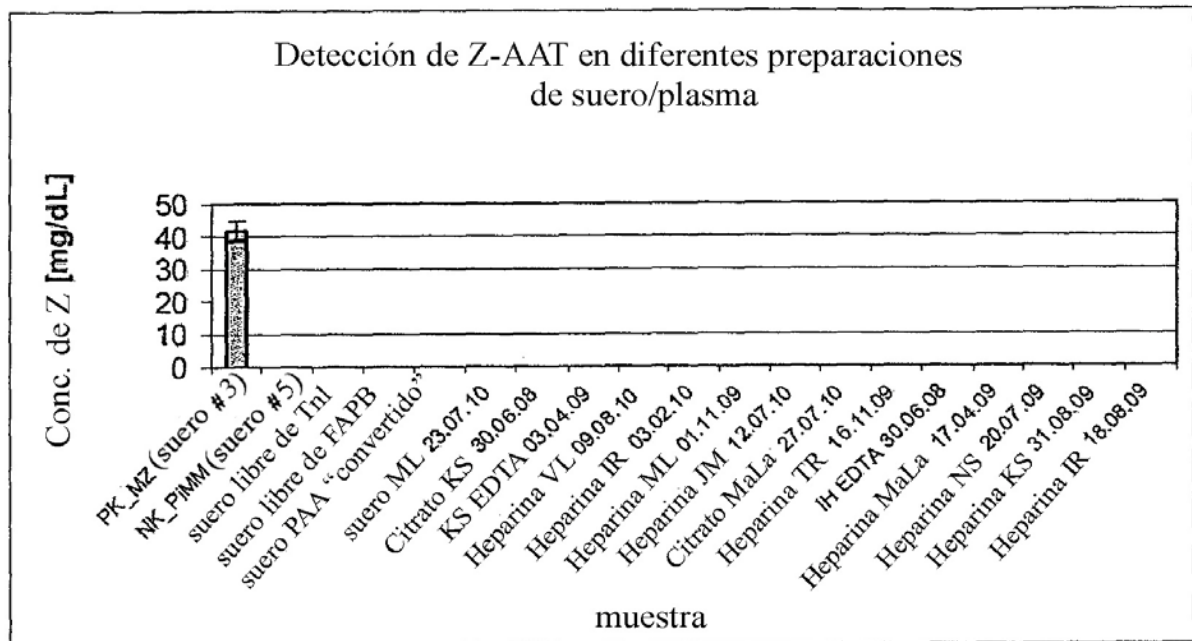


FIG. 14

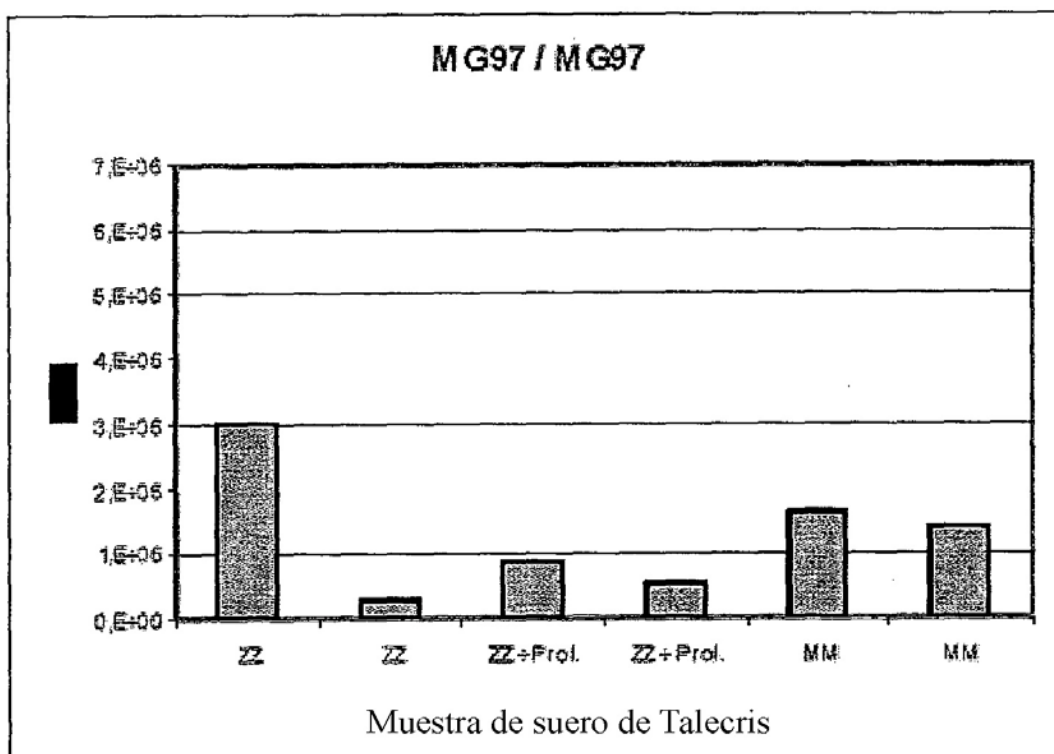


FIG. 15A

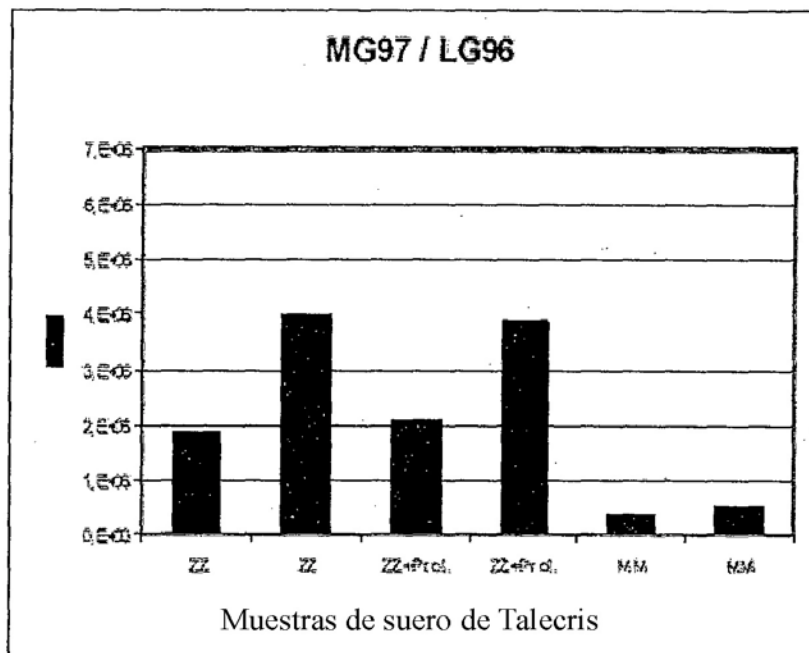


FIG. 15B

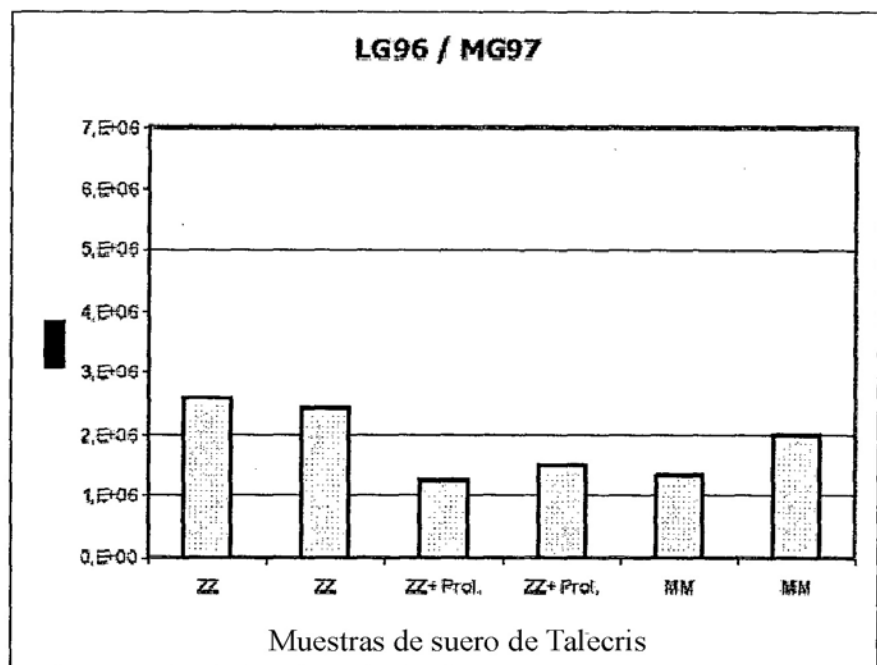
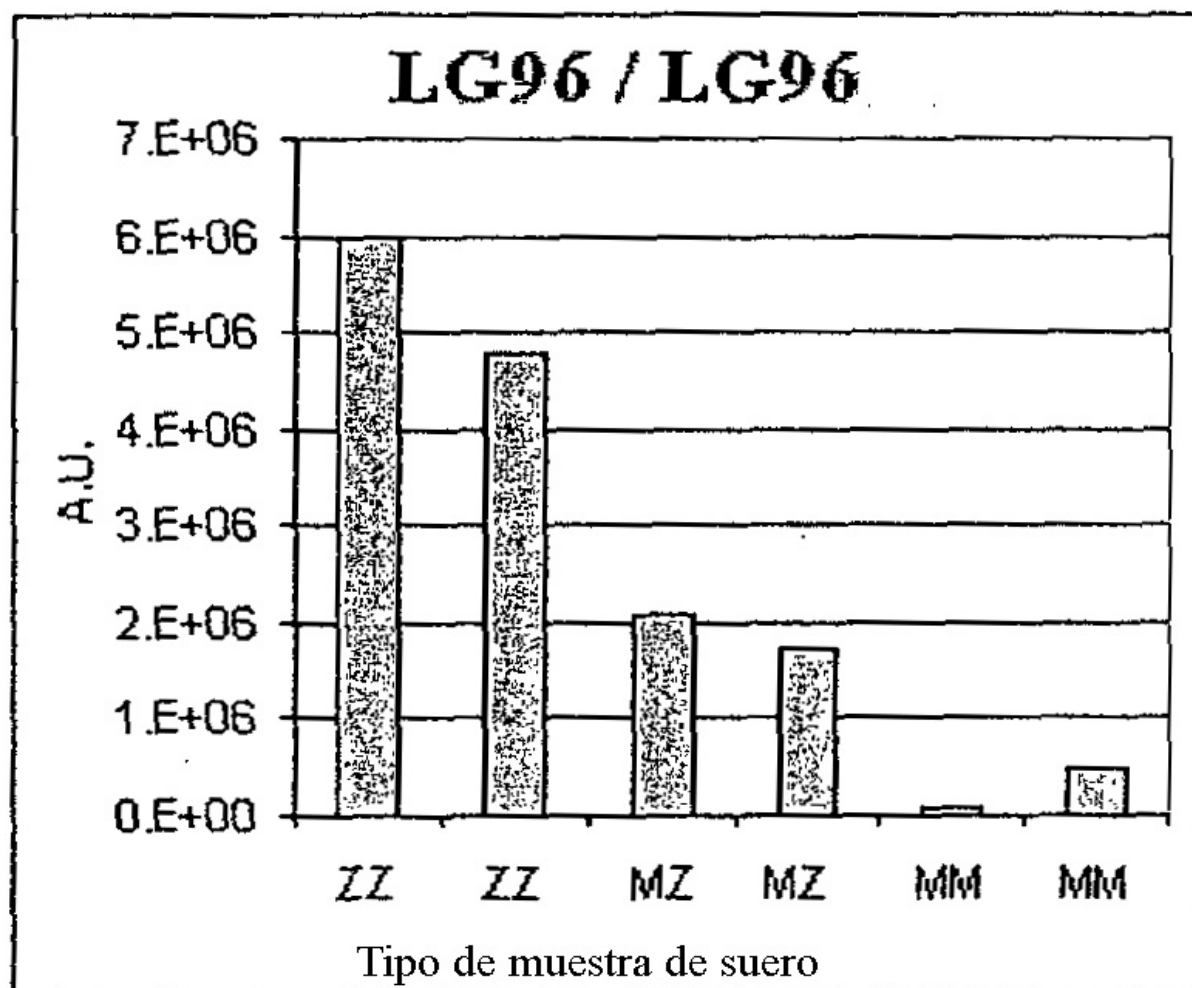


FIG. 15C

**FIG. 15D**

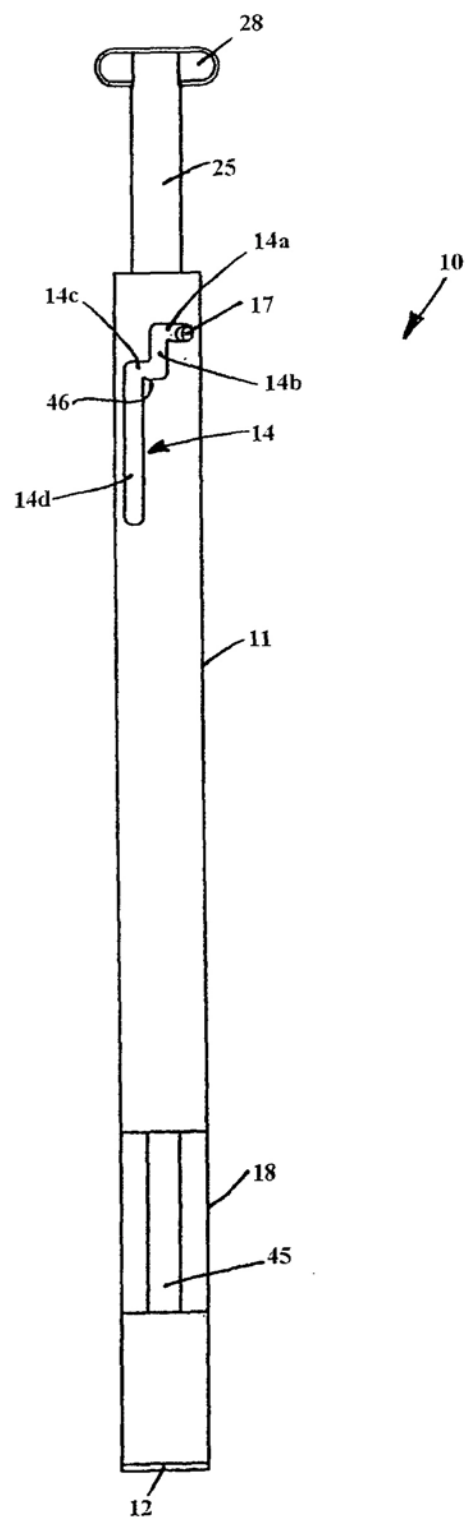


FIG. 16

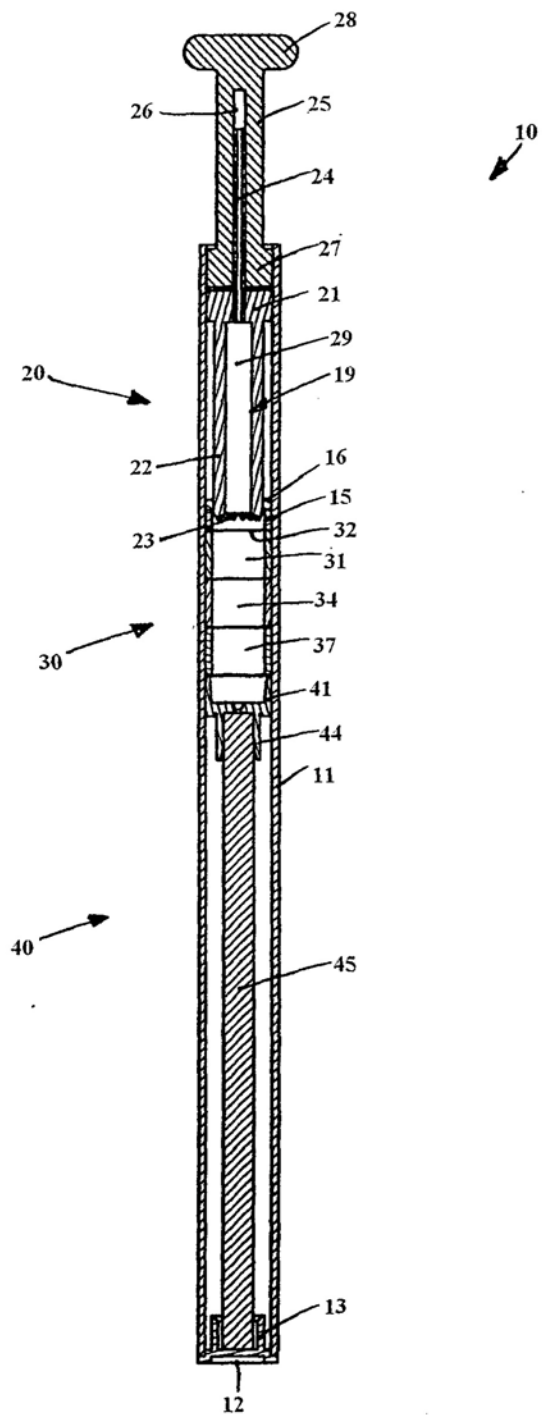


FIG. 17

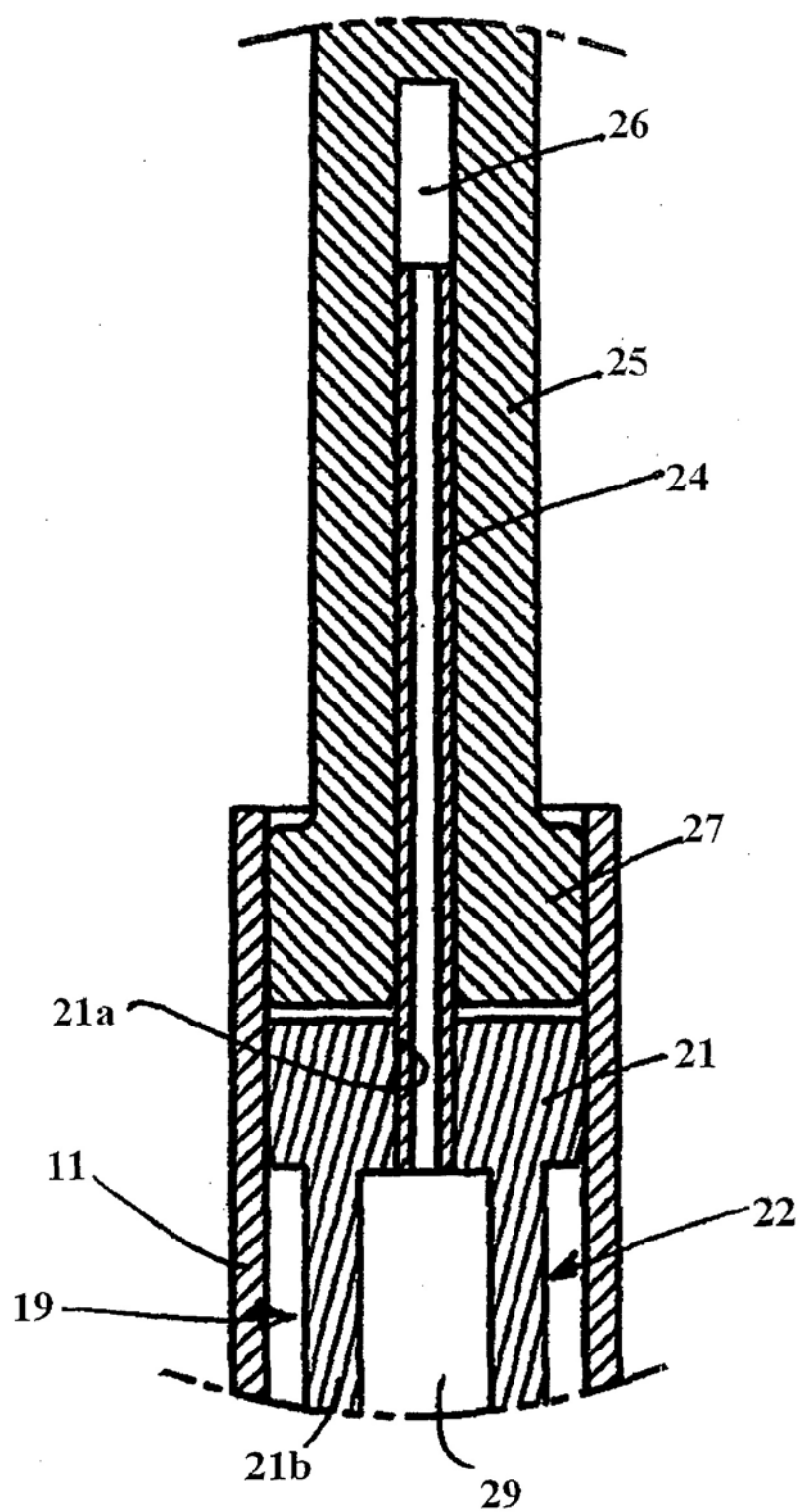


FIG. 18

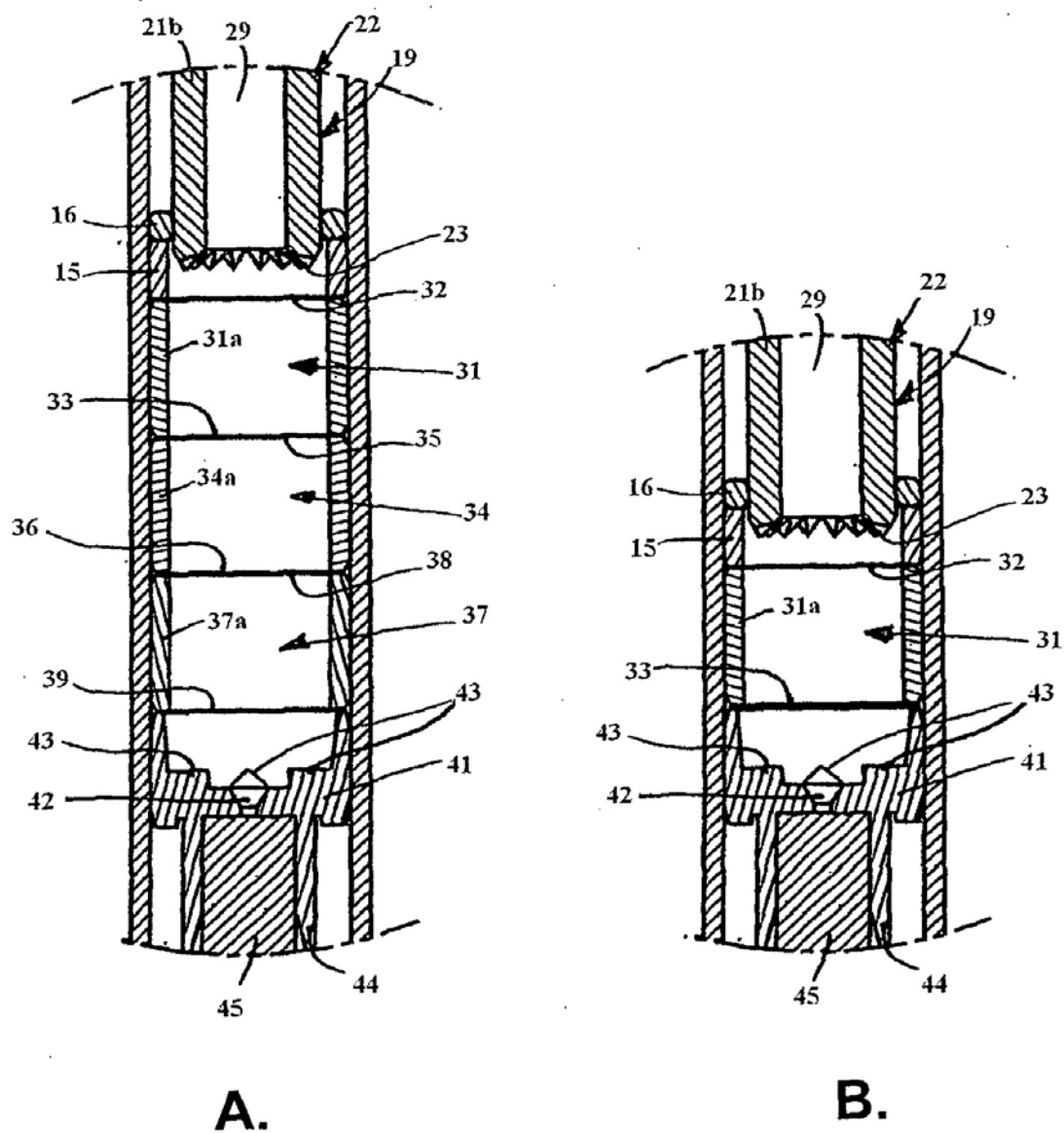


FIG. 19

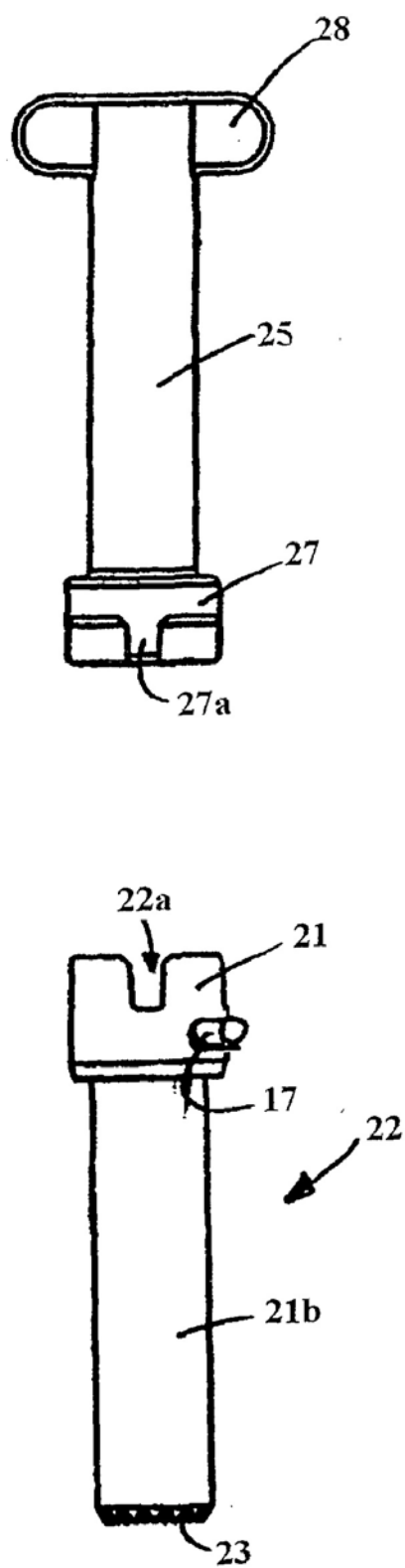


FIG. 20

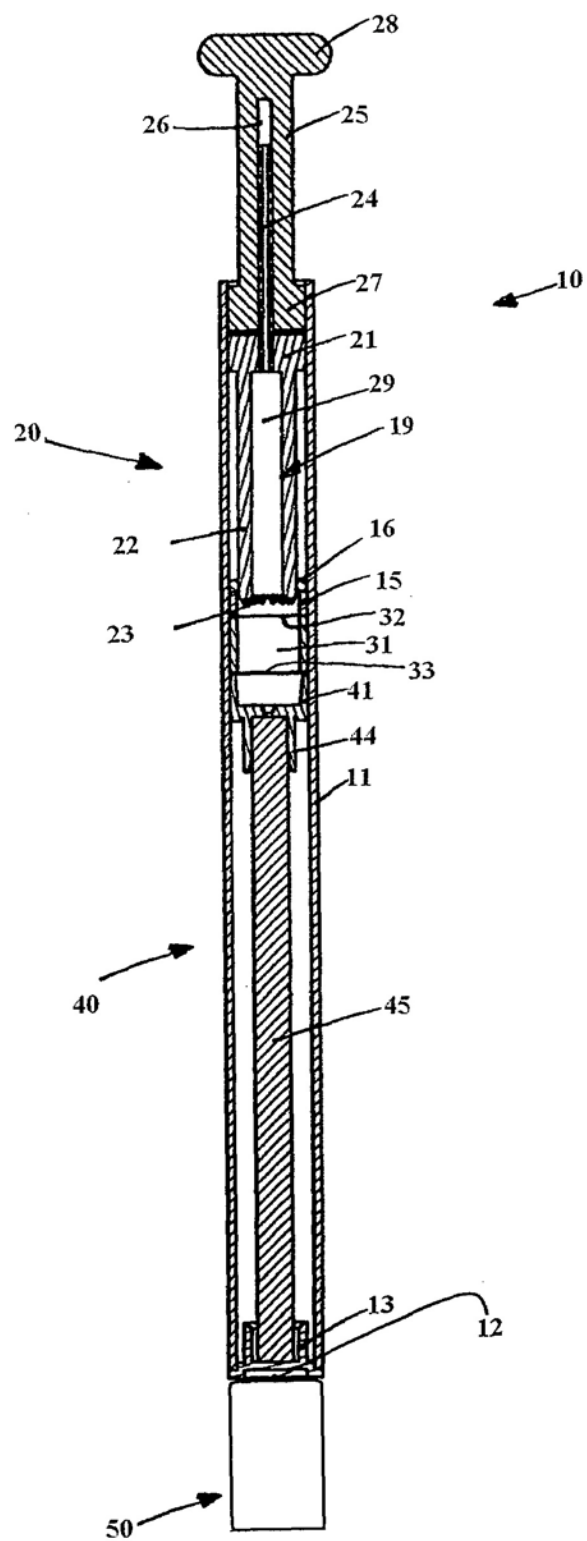


FIG. 21

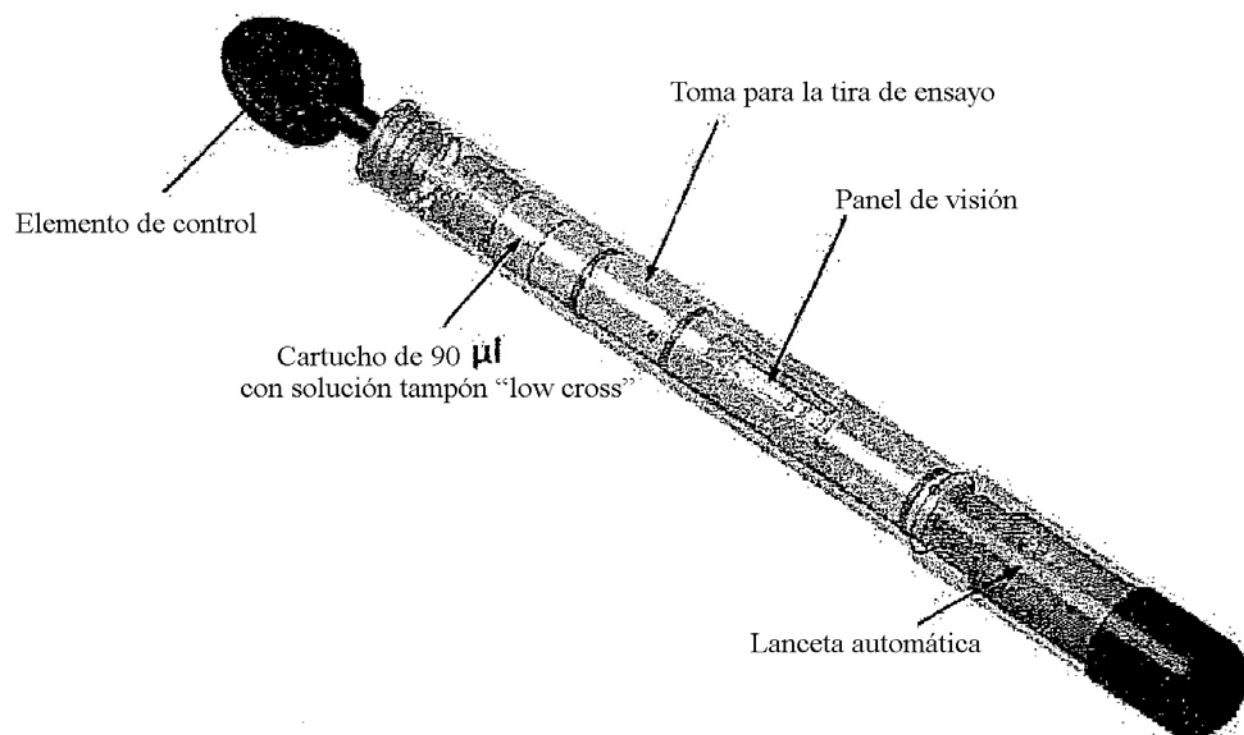


FIG. 22

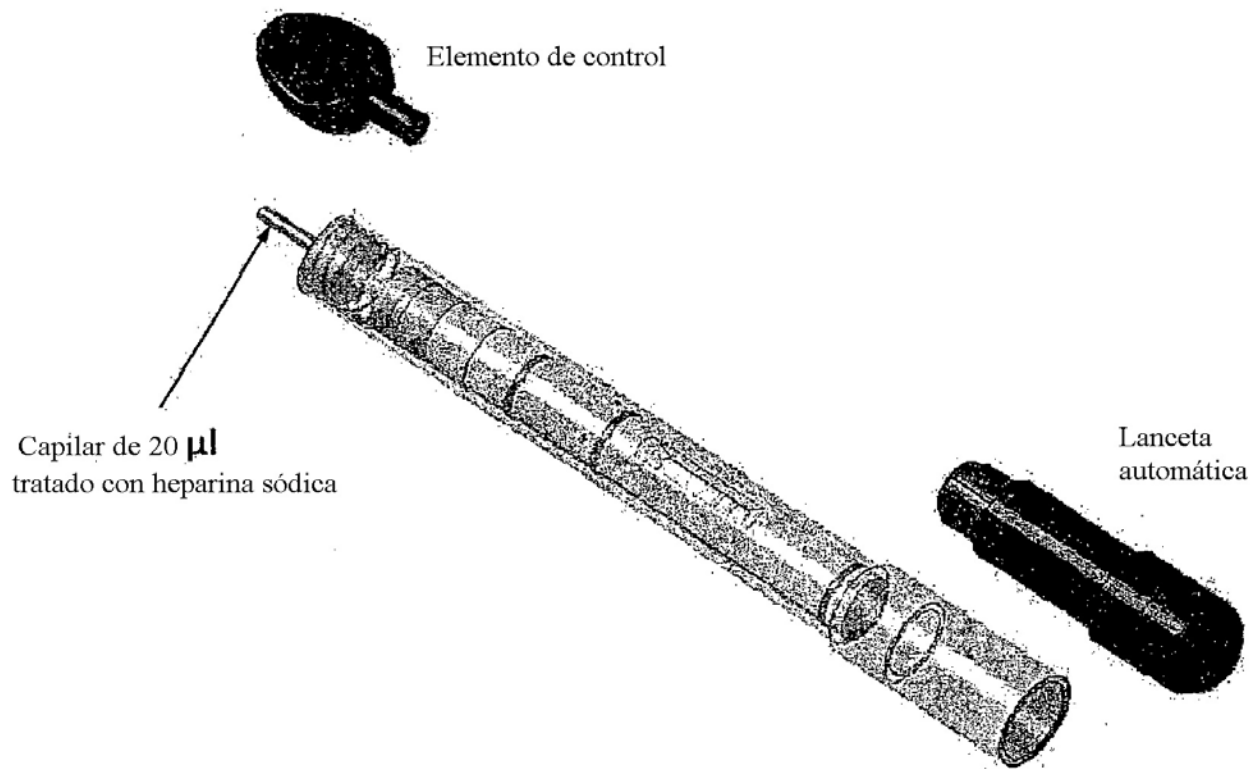


FIG. 23

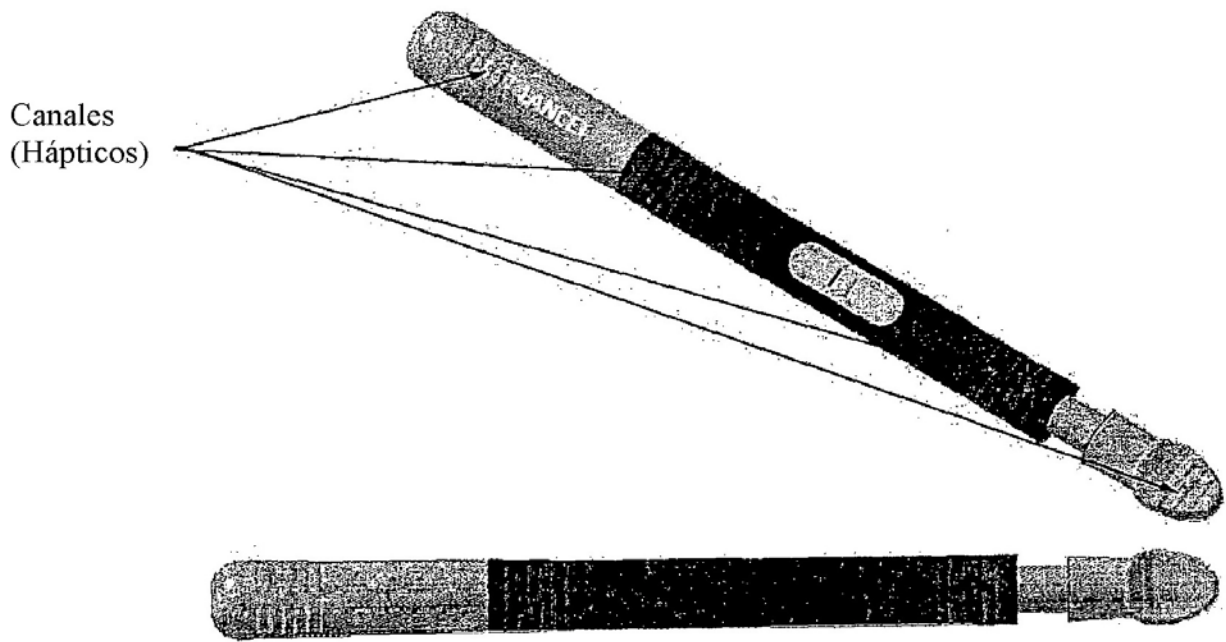


FIG. 24

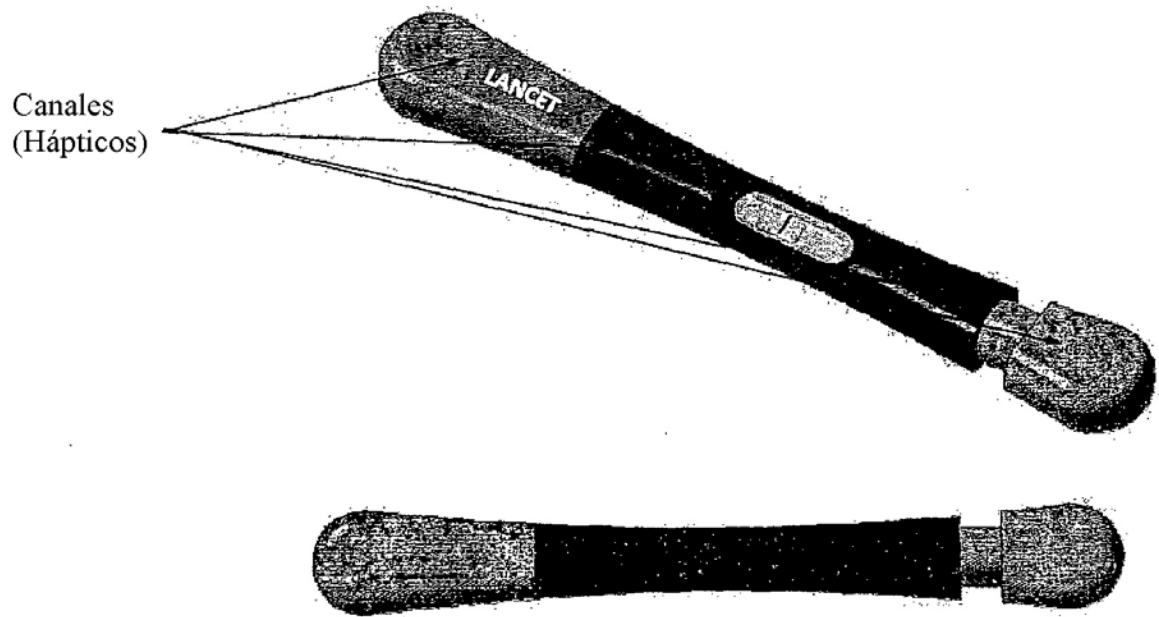


FIG. 25



FIG. 26

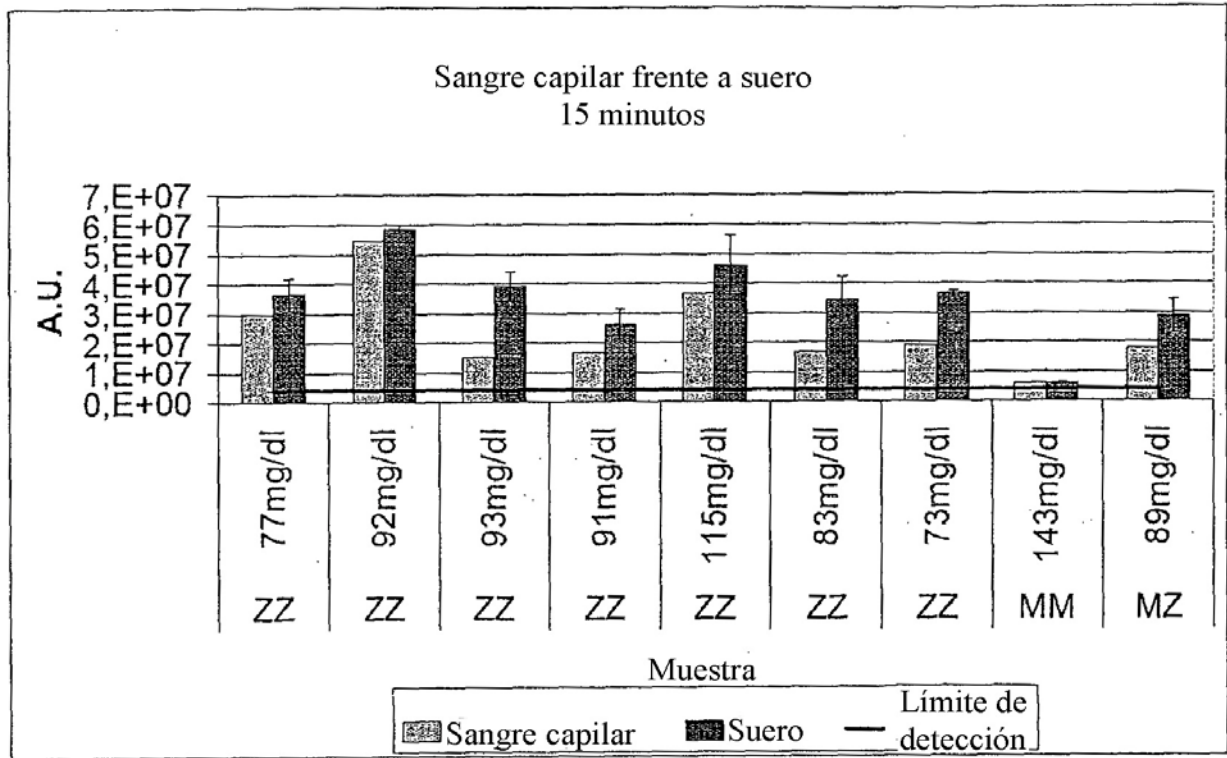


FIG. 27

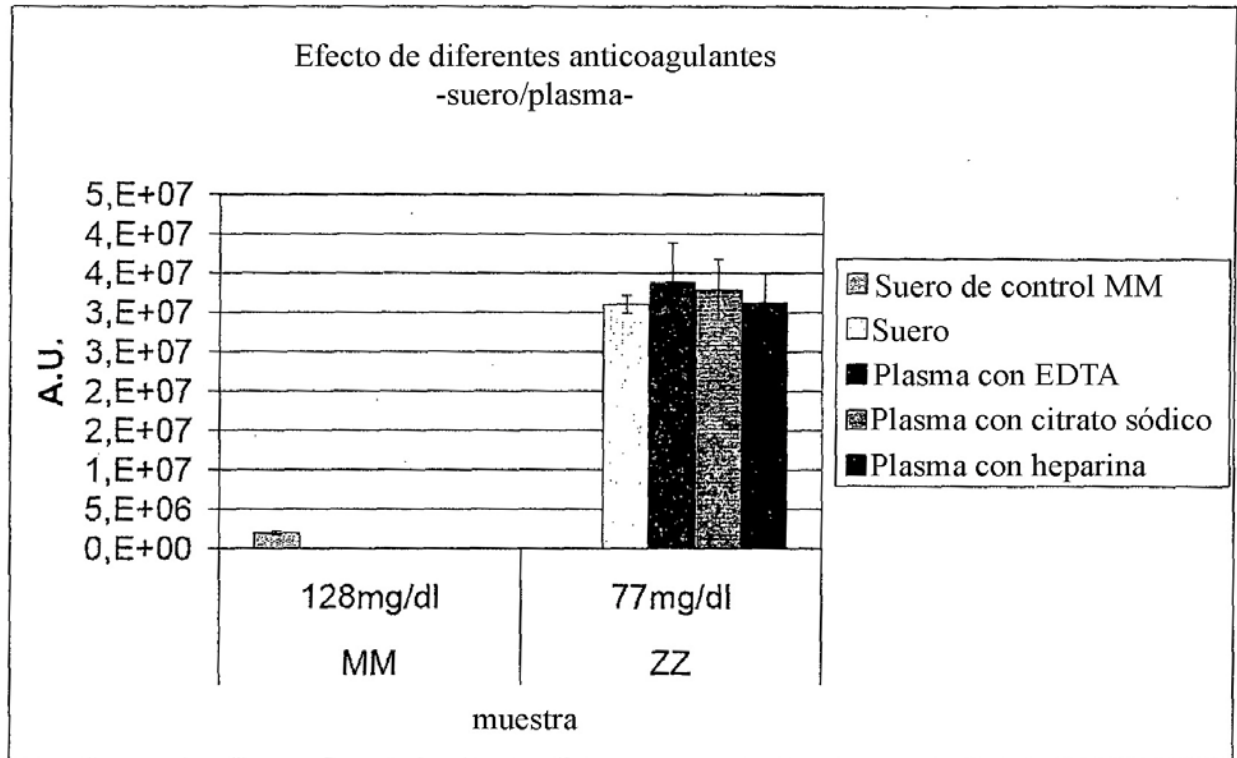
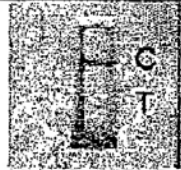
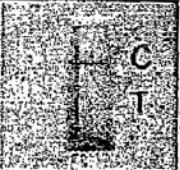
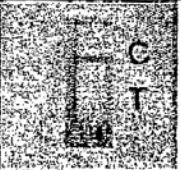
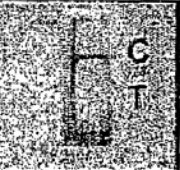
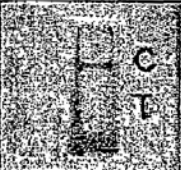
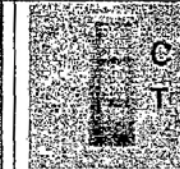
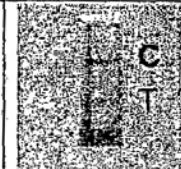


FIG. 28

A.

20µl MM					
Tiempo	10 min.	15 min.	20 min.	25 min.	30 min.
Ensayo					
Vol.	1.558.041	1.788.136	1.610.397	1.716.919	1.891.890

B.

20µl ZZ					
Tiempo	10 min.	15 min.	20 min.	25 min.	30 min.
Ensayo					
Vol.	26.859.347	30.689.655	33.985.588	36.347.652	36.806.572

C.

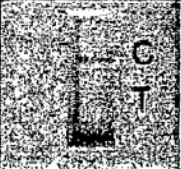
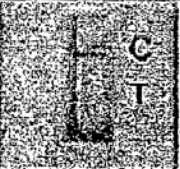
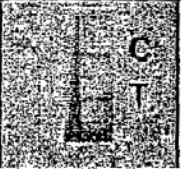
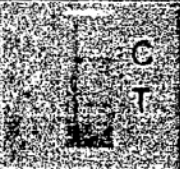
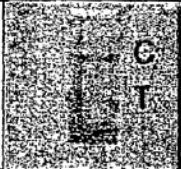
20µl SZ					
Tiempo	10 min.	15 min.	20 min.	25 min.	30 min.
Ensayo					
Vol.	18.433.081	21.820.735	24.750.239	25.795.912	26.273.308

FIG. 29

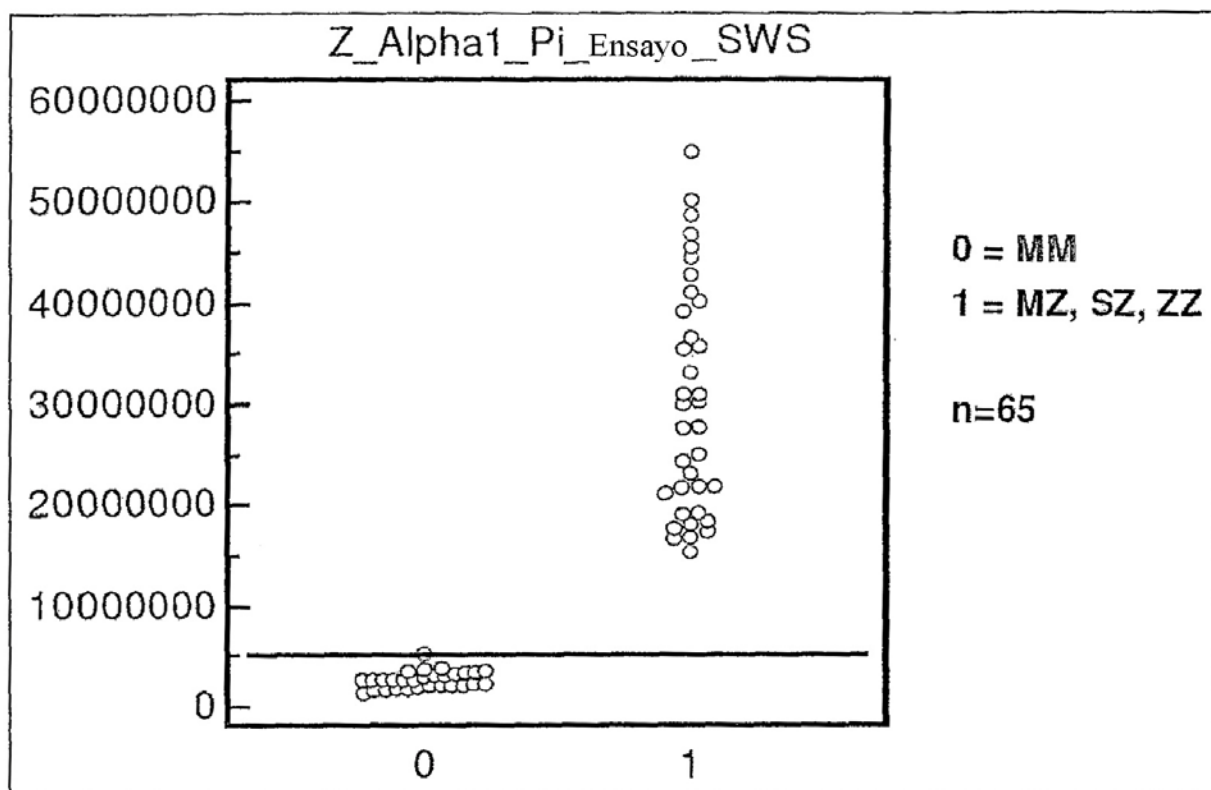


FIG. 30