

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 169**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2014 PCT/JP2014/066378**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2014 WO14203988**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2014 E 14814429 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 3012633**

54 Título: **Dispositivo de inmunocromatografía para detectar el VRS**

30 Prioridad:

21.06.2013 JP 2013130095

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

25.09.2018

73 Titular/es:

**ALFRESA PHARMA CORPORATION (50.0%)
2-9, Kokumachi 2-chome Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 540-8575, JP y
TANAKA KIKINZOKU KOGYO K.K. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KOSAKA, MIEKO;
TAGUCHI, HIROMI;
SAKAI, NOBORU;
ITOH, DAISUKE y
IWAMOTO, HISAHIKO**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 683 169 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dispositivo de inmunocromatografía para detectar el VRS

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un dispositivo de inmunocromatografía en el que al menos se inmovilizan dos tipos de anticuerpos, uno de ellos es un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína F del virus respiratorio sincicial (VRS) y el otro es un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína N del VRS. La presente invención también se refiere a un kit de ensayo del VRS que incluye el dispositivo.

Técnica anterior

El VRS es un virus que ocasiona infecciones en las vías respiratorias, y las células infectadas con el virus forman células gigantes multinucleadas (sincicios). El VRS puede ocasionar infecciones a cualquier edad durante nuestra vida, pero es el patógeno que ocasiona síntomas muy graves especialmente en lactantes. Del cincuenta al 70 por ciento o más de los lactantes se infecta con este virus un año después del nacimiento y casi todos los niños adquieren anticuerpos a los 3 años de edad. Sin embargo, la infección al cabo de algunas semanas a algunos meses después del nacimiento causa los síntomas más graves. En el caso de bebés de bajo peso al nacer o niños con inmunidad alterada o cardiopatía respiratoria subyacente, aumenta el riesgo de mayor gravedad. Hay un informe en el que la tasa de letalidad de infección por VRS es del 1 al 3%. Sin embargo, la tasa de letalidad varía enormemente dependiendo de la situación. Se ha informado que durante la década de 1980 la tasa de letalidad es tan alta como el 37 % según investigaciones realizadas en niños hospitalizados con cardiopatía subyacente.

Se han notificado infecciones por VRS en el mundo, independientemente de las condiciones geográficas o climáticas. Característicamente, las infecciones por VRS causan síntomas graves en lactantes inmaduros en todas las áreas, y se repiten varias veces cada año en áreas especialmente urbanas.

Se ha notificado que las infecciones por VRS representan alrededor del 50 % de los casos de neumonía y del 50 al 90% de los casos de bronquitis en lactantes. El pico del número de niños hospitalizados con enfermedad de las vías respiratorias bajas, tal como neumonía o bronquiolitis, coincide con el pico de brote de infecciones por VRS más que por la gripe. Durante epidemias de infecciones por VRS, la reinfección por VRS en niños de 7 a 12 años o en adultos se produce universalmente. Sin embargo, a diferencia de los síntomas graves en lactantes, los niños de 7 a 12 años o los adultos, solo muestran síntomas leves, similares a los del resfriado y, a menudo, mejoran.

Se sabe que el VRS es relativamente inestable en el medio ambiente, pero la transmisión de la infección por el VRS se produce de un modo eficaz en las familias. Un niño en edad escolar que muestra síntomas leves a menudo introduce el virus en la familia. También hay un informe de que el 44 % de las familias con un niño en edad escolar y un lactante ha sufrido una transmisión intrafamiliar de infección por VRS durante su estación epidémica. Las principales vías de infección por VRS son gotitas respiratorias grandes y contacto a través de las manos u objetos contaminados con secreciones respiratorias. Particularmente, la infección por VRS se produce mediante contacto cercano. Por lo tanto, para prevenir la infección por VRS en un lactante, es muy importante conocer con exactitud la presencia o ausencia de infección por VRS en otros miembros de la familia, independientemente de la gravedad de los síntomas. Cuando se confirma que cualquier miembro de la familia tiene infección por VRS, es muy importante evitar el contacto con el lactante y evitar la contaminación por las secreciones.

Desde el punto de vista de la prevención y el tratamiento de las infecciones por VRS, especialmente infección por VRS en lactantes, ha habido una demanda de un kit más sencillo y de mayor sensibilidad para diagnosticar rápidamente la infección por VRS. Se prefiere que los lactantes infectados con VRS reciban el tratamiento adecuado lo antes posible, lo que requiere un kit de ensayo de alta sensibilidad que pueda dar un resultado de ensayo en un corto periodo de tiempo pero que no dé un resultado negativo falso, incluso cuando el ensayo se realice en una fase inicial de infección en la que la cantidad del virus es pequeña. Además, cuando un miembro de una familia con un lactante muestra síntomas gripales y se sospecha infección por VRS, se requiere un método de ensayo sencillo mediante el cual pueda determinarse la presencia o la ausencia de infección por VRS con menores costes económicos y médicos.

Como kits de diagnóstico sencillos, de alta sensibilidad y rápidos que satisfacen dicho requisito, se han desarrollado kits de ensayo de VRS inmunocromatográficos. Actualmente, se conoce más de un kit de ensayo inmunocromatográfico que puede detectar un antígeno vírico y que puede utilizarse para ayudar a diagnosticar infecciones por VRS. Sin embargo, todos estos kits utilizan anticuerpos contra la proteína F del VRS (Bibliografía de Patente 1 a 3).

La proteína F del VRS es uno de los dos tipos de glucoproteínas principales presentes en la superficie del VRS. En la superficie del virus, además de la proteína F también se encuentra la proteína G. La proteína F está muy conservada entre y dentro de los subtipos A y B del VRS en cuanto a homología, mientras que la homología de la proteína G entre los subtipos solo es de aproximadamente el 53 %. Investigaciones realizadas por Beeler y Coelingh

(1989) demostraron que los anticuerpos contra la proteína F del VRS podían unirse a los 14 aislados clínicos aislados en diversas regiones de los Estados Unidos de América y Australia de 1956 a 1985 y que la proteína F está muy conservada entre las cepas de virus (Bibliografía de Patente 4, Bibliografía no de Patente 1).

5 Los anticuerpos contra la proteína F se han utilizado en kits de detección del VRS con la esperanza de que puedan detectarse diversos aislados clínicos sin excepción debido a epítomos muy conservados. Sin embargo, la detección del VRS utilizando dichos kits de ensayo convencionales del VRS, implica un problema principal que determina que del 30 al 40 % de las muestras determinadas como positivas por otro método de ensayo, son negativas. La razón por la cual los kits de ensayo inmunocromatográficos dan probablemente resultados negativos falsos es que se ha considerado que los anticuerpos contra la proteína F utilizados en estos kits, no tienen suficientes afinidades de unión. Si las afinidades de unión no son suficientes, no pueden detectarse señales positivas claras cuando la cantidad de virus contenida en las muestras es pequeña y, en consecuencia, las muestras se consideran como negativas falsas. Para desarrollar un kit de ensayo muy sensible en el que pueda detectarse una señal clara, incluso cuando la cantidad de virus es pequeña, se ha hecho un intento de preparar un anticuerpo monoclonal que tenga una alta afinidad por la proteína F del VRS (Bibliografía de Patente 5). Sin embargo, es muy difícil desarrollar un kit de ensayo del VRS que pueda detectar aislados clínicos sin excepción, así como que pueda conseguir una tasa de detección positiva práctica, simplemente aumentando la afinidad de un anticuerpo por la proteína F.

20 La Bibliografía no de Patente 2 da a conocer ensayos para el VRS. En ella se describe que hay diversos ensayos de VRS rápidos actualmente disponibles que utilizan dos tecnologías principales, las del inmunoensayo enzimático y las del flujo lateral.

Listado de citas bibliográficas

25 Bibliografía de Patente

Bibliografía de Patente 1: JP 2008-14751 A
 Bibliografía de Patente 2: JP 2008-122372 A
 Bibliografía de Patente 3: JP 2008-164403 A
 30 Bibliografía de Patente 4: JP 2004-534513 A
 Bibliografía de Patente 5: JP 2010-25745 A

Bibliografía que no es de Patente

35 Bibliografía no de Patente 1: Journal of Virology, julio de 1989, Vol. 63, N^o. 7, págs. 2941-2950
 Bibliografía no de Patente 2: Becton *et al* "Understanding RSV Testing" septiembre de 2004, pág. 108, dominio registrado: URL:http://www.bd.com/ds/technical/Center/technicalBulletins/tb_0_2689.pdf

40 Sumario de la invención

Problema técnico

45 La presente invención proporciona un dispositivo de inmunocromatografía sencillo y muy sensible y un kit de ensayo de inmunocromatografía para detectar el VRS que incluye un medio de cromatografía que tiene una región de determinación que utiliza un anticuerpo que se une específicamente a la proteína F del VRS. La presente invención también proporciona un método para detectar el VRS utilizando el dispositivo o el kit de ensayo, y un método para determinar o diagnosticar una infección por VRS utilizando el dispositivo o el kit de ensayo.

50 Adicionalmente, la presente invención proporciona; un dispositivo de inmunocromatografía y un kit de ensayo de inmunocromatografía que tiene la capacidad de detectar, de un modo eficaz, el VRS incluso cuando la cantidad de virus contenida en una muestra es pequeña, un método para detectar el VRS utilizando el dispositivo o el kit de ensayo, y un método para determinar o diagnosticar una infección por VRS utilizando el dispositivo o el kit de ensayo.

55 Solución al problema

Para permitir que una región de determinación capture de modo eficaz el VRS contenido en una muestra con el fin de mejorar la sensibilidad de un dispositivo de inmunocromatografía, los autores de la presente invención han estudiado un anticuerpo de mayor afinidad contra la proteína F inmovilizada en la región de determinación. Asimismo, los autores de la presente invención han estudiado la inmovilización del anticuerpo contra la proteína F de VRS en combinación con un anticuerpo contra otra proteína del VRS. Como resultado, los autores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que, cuando el anticuerpo contra la proteína F se inmoviliza en combinación con un anticuerpo contra la proteína N (proteína nuclear) del VRS, la señal de muestras positivas puede potenciarse en comparación con cuando el anticuerpo contra la proteína F se inmoviliza individualmente. Además, los autores de la presente invención han descubierto que cuando el anticuerpo contra la proteína F se inmoviliza en la región de determinación en combinación con el anticuerpo contra la proteína N, una muestra puede

- determinarse con precisión como positiva incluso cuando la muestra se determina como negativa mediante un método inmunocromatográfico convencional. Utilizando los métodos inmunocromatográficos convencionales, algunas muestras no se determinan con precisión como positivas incluso aunque en las muestras se haya confirmado la presencia de una cantidad suficiente de virus por el método de la PCR o uno similar. Los autores de la presente invención han descubierto que las muestras se determinan con precisión combinando, en la región de determinación, un anticuerpo contra la proteína F y un anticuerpo contra la proteína N y que por tanto las tasas de concordancia positivas del método inmunocromatográfico con otros métodos de ensayo pueden mejorarse significativamente.
- Es decir, la presente invención se refiere a un dispositivo de inmunocromatografía que, como componente, incluye un medio de cromatografía en el que en una región de determinación se inmovilizan al menos un anticuerpo que se une específicamente a la proteína F y al menos un anticuerpo que se une específicamente a la proteína N.
- Adicionalmente, la presente invención se refiere a un kit de ensayo del VRS que incluye el dispositivo de inmunocromatografía.
- Adicionalmente, la presente invención se refiere a un método para detectar el VRS utilizando un dispositivo de inmunocromatografía en el que en una región de determinación se inmovilizan al menos un anticuerpo que se une específicamente a la proteína F y al menos un anticuerpo que se une específicamente a la proteína N.
- Adicionalmente, la presente invención se refiere a un método para mejorar una tasa de detección del VRS mediante un método de inmunocromatografía que incluye un procedimiento que consiste en poner en contacto una muestra líquida con al menos un anticuerpo contra la proteína F y al menos un anticuerpo contra la proteína N que se encuentran inmovilizados en una región de determinación.
- Se describirán realizaciones de la presente invención con más detalle con referencia a los siguientes puntos (1) a (11)
- (1) Un dispositivo de inmunocromatografía que incluye un medio de cromatografía que tiene una región de determinación en la que se inmovilizan al menos un anticuerpo que se une específicamente a una proteína F del virus respiratorio sincicial (VRS) y al menos un anticuerpo que se une específicamente a una proteína N del VRS.
 - (2) El dispositivo de inmunocromatografía de acuerdo el punto (1) anterior, que incluye esencialmente una parte de adición de muestra, el medio de cromatografía y una parte de absorción.
 - (3) El dispositivo de inmunocromatografía de acuerdo con el punto (2) anterior, que incluye adicionalmente una parte de contención de reactivo de marcaje.
 - (4) El dispositivo de inmunocromatografía de acuerdo con los puntos (1) a (3) anteriores, en el que el anticuerpo que se une específicamente a la proteína F es al menos un anticuerpo que se une específicamente a una o a ambas de una proteína F del subgrupo A del VRS y a una proteína F del subgrupo B del VRS.
 - (5) Un kit de ensayo de inmunocromatografía para el VRS que incluye: un dispositivo de inmunocromatografía de acuerdo con el punto (1) anterior que incluye un medio de cromatografía que tiene una región de determinación en la que se inmoviliza al menos un anticuerpo que se une específicamente a una proteína F del VRS y al menos un anticuerpo que se une específicamente a una proteína N del VRS; y un diluyente de muestra.
 - (6) El kit de ensayo de inmunocromatografía para el VRS de acuerdo con el punto (5) anterior, en el que el dispositivo de inmunocromatografía incluye esencialmente una parte de adición de muestra, el medio de cromatografía y una parte de absorción.
 - (7) El kit de ensayo de inmunocromatografía para el VRS de acuerdo con el punto (6) anterior, en el que el dispositivo de inmunocromatografía incluye adicionalmente una parte de contención de reactivo de marcaje.
 - (8) El kit de ensayo de inmunocromatografía para el VRS de acuerdo con el punto (6) anterior, que incluye adicionalmente una solución de reactivo de marcaje.
 - (9) El uso de un dispositivo de inmunocromatografía que tiene una región de determinación en la que para detectar el VRS se inmoviliza al menos un anticuerpo que se une específicamente a una proteína F del virus respiratorio sincicial (VRS) y al menos un anticuerpo que se une específicamente a una proteína N del VRS.
 - (10) Un método de inmunocromatografía para detectar el virus respiratorio sincicial (VRS), que incluye:
 - (a) un procedimiento que proporciona un líquido de muestra, que contiene una muestra, a un dispositivo de inmunocromatografía, en el que al menos un anticuerpo que se une específicamente a una proteína F del VRS y al menos un anticuerpo que se une específicamente a una proteína N del VRS se inmovilizan en una región de determinación;
 - (b) un procedimiento que permite suministrar el líquido de muestra del procedimiento (a) para que pase a través de la región de determinación junto con un reactivo de marcaje;
 - (c) un procedimiento para poner en contacto el líquido de muestra que contiene el reactivo de marcaje, con los anticuerpos inmovilizados en la región de determinación; y
 - (d) un procedimiento para determinar la muestra como "positiva al VRS" cuando se detecta coloración causada por el reactivo de marcaje.
 - (11) El método de inmunocromatografía para detectar el VRS de acuerdo con el punto (10) anterior, que adicionalmente incluye un procedimiento que consiste en diluir la muestra con un diluyente de muestra, antes de

que la muestra se suministre al dispositivo de inmunocromatografía.

Efectos ventajosos de la invención

5 El dispositivo de inmunocromatografía de acuerdo con la presente invención, incluye un medio de cromatografía que tiene una región de determinación formada por la inmovilización, en el interior de la misma, de al menos un anticuerpo que se une específicamente a la proteína F del VSR y al menos un anticuerpo que se une específicamente a la proteína N del VSR. El uso de una mezcla de estos dos tipos de anticuerpos en la misma región de determinación, posibilita la captura eficaz de un antígeno del VSR y potencia una señal obtenida por la medición de una muestra positiva en comparación con la de un kit de ensayo, en el que uno de los anticuerpos se inmoviliza individualmente. Por lo tanto, el dispositivo de inmunocromatografía de acuerdo con la presente invención, proporciona un kit de diagnóstico rápido del VSR, muy sensible y fiable y sencillo. Dado que se obtiene una señal positiva potenciada, el VSR puede detectarse con alta sensibilidad incluso cuando la cantidad de virus contenida en la muestra es pequeña. Por lo tanto, la presencia del VSR puede determinarse con precisión incluso cuando se recoge una muestra de un paciente en la fase de infección inicial. Además, incluso cuando una muestra se diluye, si fuese necesario, el VSR puede detectarse con alta sensibilidad. Por lo tanto, es posible, impedir que surja un problema causado directamente por el revelado de una muestra viscosa, tal como un frotis nasal o faríngeo. El problema de que una muestra sea viscosa es no puede desplazarse en el medio de cromatografía, de manera que la determinación resulta ser imposible, o el problema es que un componente contenido en la muestra, que no sea el VSR, se adsorba al medio de cromatografía, de tal manera que se genere una señal inespecífica. El dispositivo de inmunocromatografía de acuerdo con la presente invención puede impedir que se produzcan estos problemas.

Adicionalmente, el anticuerpo que se une específicamente a la proteína N inmovilizada en la región de determinación en la presente invención, permite que en dicha región se capture un antígeno del VSR incluso cuando se pierde la antigenicidad de la proteína F contenida en una muestra. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, es posible determinar con precisión si una muestra que contiene el VSR es positiva. Dado que la presencia del VSR puede determinarse fiablemente incluso cuando se pierde la antigenicidad de la proteína F, también es posible tratar previamente o conservar una muestra en condiciones más rigurosas que influyan sobre la antigenicidad de la proteína F. Por lo tanto, una muestra que convencionalmente es inadecuada para la inmunocromatografía debido a que tiene una viscosidad demasiado alta, puede desnaturalizarse apropiadamente ajustando las condiciones de tratamiento previo o conservación, de manera que la muestra pueda desplazarse en el medio de cromatografía en un tiempo predeterminado. Esto posibilita realizar un ensayo rápido y preciso independientemente del estado de la muestra.

El dispositivo de inmunocromatografía de acuerdo con la presente invención, utiliza el anticuerpo contra la proteína F en combinación con el anticuerpo contra la proteína N, y por lo tanto, es posible no solo detectar una baja concentración de VSR con alta sensibilidad, sino también determinar con precisión si una muestra que contiene una cantidad suficiente de virus es positiva sin excepción. Como resultado, puede aumentarse significativamente una tasa de detección de virus en comparación con la de los kits de ensayo de inmunocromatografía convencionales, y también pueden mejorarse significativamente las tasas de concordancia positivas en comparación con las de otros métodos de ensayo. Por lo tanto, la presente invención hace posible proporcionar un método de ensayo del VSR útil que no solo consigue sencillez y rapidez, que son ventajosas particulares de la inmunocromatografía, sino también una tasa de detección de virus comparable a las de otros métodos de ensayo.

45 Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una vista en sección esquemática de un dispositivo de inmunocromatografía. Normalmente, el dispositivo incluye una parte de adición de muestra (1), un medio de cromatografía (3) que tiene una región de determinación (4), una parte de absorción (5) y una lámina de apoyo (6) y opcionalmente puede incluir una parte de contención de reactivo de marcaje (2).

Descripción de realizaciones

Las realizaciones de la presente invención se describirán con más detalle.

55 En la presente invención, en una región de determinación, se utiliza tanto un anticuerpo que se une específicamente a la proteína F del VSR, como un anticuerpo que se une específicamente a la proteína N del VSR. Y la presencia del VSR en una muestra puede determinarse detectando, en la muestra, la proteína F y/o la proteína N del VSR, basándose en principios inmunocromatográficos.

60 En la presente invención, la expresión el "anticuerpo que se une específicamente a la proteína F" del VSR, se refiere a un anticuerpo que reconoce y se une específicamente a la proteína F del VSR infeccioso de seres humanos.

65 El VSR es un tipo de virus de ARN perteneciente a la familia *Paramyxoviridae*, y se clasifica en dos subtipos A y B. La secuencia genética del VSR se ha determinado con anterioridad.

La proteína F del VSR es una de las tres glicoproteínas presentes en la superficie del VSR. La proteína F también se denomina proteína de fusión ya que promueve la fusión entre la membrana de la envoltura del virus y la membrana celular de una célula sensible, para permitir que la ribonucleoproteína del virus entre en el citoplasma de la célula. Además, la proteína F promueve la fusión entre la membrana celular de una célula infectada por el virus y la membrana celular de una célula adyacente a la célula infectada por el virus, de tal manera que se forma un sincicio.

La proteína F es una proteína heterodimérica de aproximadamente 70 kDa en la que un polipéptido F1 de aproximadamente 50 kDa y un polipéptido F2 de aproximadamente 20 kDa están ligados mediante enlace disulfuro. El polipéptido F1 y el polipéptido F2 se generan por escisión de un precursor de la proteína F denominado F0.

Se conocen las secuencias de aminoácidos de la proteína F de algunas cepas del VSR. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la cepa Long del VSR se desvela con el número de registro P12568 en la base de datos GenBank del NCBI.

En la presente invención, el anticuerpo que se une específicamente a la proteína F del VSR no está particularmente limitado siempre que el anticuerpo se una específicamente a la proteína F de una cepa infecciosa del VSR de seres humanos. El anticuerpo puede reconocer cualquier epítipo, por ejemplo, un epítipo del polipéptido F1, un epítipo del polipéptido F2 o un epítipo tridimensional formado por un enlace disulfuro entre ambos. Sin embargo, para impedir que el virus no pueda detectarse debido a la diferencia en cuanto al subtipo, se prefiere un anticuerpo que reconozca un epítipo común a los subtipos A y B del VSR y que se una a la proteína F de cada cepa de virus de subtipo A y subtipo B.

En la presente invención, la expresión "anticuerpo que se une específicamente a la proteína N" del VSR, se refiere a un anticuerpo que reconoce y se une específicamente a la proteína N del VSR infeccioso de seres humanos.

La proteína N del VSR también se denomina proteína nuclear, y está compuesta por 391 restos de aminoácido. La proteína N es un componente y un complejo ribonucleoprotéico denominado nucleocápside, y rodea al ARN genómico del VSR para formar una estructura helicoidal. Se conocen las secuencias de aminoácidos de la proteína N de algunas cepas del VSR. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la cepa Long del VSR se desvela con el número de registro DD857370 en la base de datos GenBank del NCBI. La secuencia de aminoácidos de la proteína N está muy bien conservada entre las cepas del SVR de los subtipos A y B.

En la presente invención, el anticuerpo que se une específicamente a la proteína N del VSR no está particularmente limitado siempre que el anticuerpo se una específicamente a la proteína N de una cepa del VSR infecciosa de seres humanos. El anticuerpo puede reconocer cualquier epítipo en la proteína N. Sin embargo, para impedir que el virus no pueda detectarse debido a la diferencia en cuanto al subtipo, se prefiere un anticuerpo que reconozca un epítipo común a los subtipos A y B del VSR y que se una a la proteína F de cada cepa de virus de subtipo A y subtipo B.

El anticuerpo utilizado en la presente invención puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Sin embargo, teniendo en cuenta su alta afinidad de unión, aporte de estabilidad, facilidad de control de calidad del producto, etc., el anticuerpo es preferentemente monoclonal.

El anticuerpo utilizable en la presente invención puede producirse de acuerdo con métodos conocidos o está disponible en el comercio.

El anticuerpo que reconoce la proteína F o la proteína N, utilizado en la presente invención, puede producirse administrando la proteína F o la proteína N del VSR, utilizadas como un inmunógeno, a un animal productor de anticuerpos, tal como un ratón, una rata, una cobaya, un perro, una cabra, una oveja, un cerdo, un caballo o una vaca. La proteína F o la proteína N del VSR, utilizada como un inmunógeno, puede tener cualquier forma siempre que pueda ejercer su acción como un inmunógeno. Por ejemplo, la proteína F o la proteína N administrada, puede estar en forma de VSR purificado, células infectadas por VSR o un extracto de los mismos, en forma de proteína purificada, o de un péptido sintético de una parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína. Como se ha descrito anteriormente, se conocen las secuencias de aminoácidos de la proteína F y de la proteína N, para la preparación de péptidos sintéticos.

Cuando el anticuerpo utilizado en la presente invención es policlonal, el anticuerpo policlonal puede prepararse de la manera habitual. Por ejemplo, el inmunógeno se administra a un animal productor de anticuerpos, y después se extrae la sangre del animal. La sangre se purifica, por ejemplo, por cromatografía de afinidad, utilizando un transportador con la proteína F o la proteína N para obtener una fracción de inmunoglobulina que produzca una reacción de antígeno-anticuerpo con la proteína F o la proteína N del VSR que sin produzca esencialmente una reacción de antígeno-anticuerpo con otros componentes del VSR.

Cuando el anticuerpo utilizado en la presente invención es monoclonal, el anticuerpo monoclonal puede producirse, por ejemplo, preparando hibridomas que produzcan, de la manera habitual, en un anticuerpo deseado. Un hibridoma productor de anticuerpos puede prepararse, por ejemplo, administrando al inmunógeno a un animal, recogiendo los esplenocitos del animal y después fusionando dichos esplenocitos con células tumorales, tales como células de

mieloma, en técnicas conocida (véase, por ejemplo, Nature, 256: 495-497 (1975)).

A partir de los hibridomas obtenidos por fusión celular, aquellos que producen un anticuerpo deseado pueden seleccionarse mediante un método de exploración tal como ELISA en fase sólida, utilizando una microplaca que
5 tenga la proteína F o la proteína N inmovilizada en su interior.

El anticuerpo utilizado en la presente invención puede prepararse cultivando los hibridomas en un medio de cultivo normalmente utilizado para cultivo celular y recogiendo el anticuerpo del sobrenadante del cultivo. Como alternativa, el anticuerpo utilizado en la presente invención puede prepararse inyectando los hibridomas en la cavidad peritoneal
10 de un animal, que sea de la misma especie de animales a partir de los cuales procede el hibridoma, para acumular ascitis y recoger el anticuerpo de la ascitis.

El anticuerpo que reconoce la proteína F o la proteína N, utilizado en la presente invención, puede producirse de la manera anterior, pero también está disponible en el comercio de más de un proveedor, como se describe, por
15 ejemplo, en el documento JP 2004-511807A. En la presente invención puede utilizarse dicho anticuerpo disponible en el comercio.

Un "dispositivo de inmunocromatografía" de acuerdo con la presente invención, incluye esencialmente una parte de adición de muestra, un medio de cromatografía y una parte de absorción, y opcionalmente puede incluir una parte de
20 contención de reactivo de marcaje.

El "medio de cromatografía" utilizado en la presente invención no está particularmente limitado siempre que el medio de cromatografía esté compuesto de una membrana porosa de tal manera que un líquido de muestra que contenga una muestra, pueda desplazarse en su interior mediante acción capilar, aunque preferentemente se utiliza una
25 membrana porosa que tiene un diámetro de poro promedio de 0,3 a 15 μm . El medio de cromatografía se fabrica preferentemente de un material inactivo que no reaccione con los componentes disueltos en una muestra y que pueda inmovilizar en su interior un anticuerpo. Los ejemplos de dicho material inactivo incluyen nitrocelulosa, acetato de celulosa, nailon, poliétersulfona, alcohol polivinílico, poliésteres, fibras de vidrio, poliolefinas, celulosa y polímeros sintéticos fabricados de fibras combinadas de los mismos.

En la presente invención, el anticuerpo que se une específicamente a la proteína F del VSR y el anticuerpo que se une específicamente a la proteína N del VSR, se inmovilizan sobre parte del medio de cromatografía, para formar una "región de determinación".

El anticuerpo contra la proteína F y el anticuerpo contra la proteína N, pueden inmovilizarse conjuntamente en toda la región de la región de determinación, o pueden inmovilizarse individualmente en sus regiones divididas respectivas de la región de determinación. Sin embargo, preferentemente, los dos anticuerpos se inmovilizan conjuntamente en la misma región de la región de determinación, porque puede obtenerse el efecto de potenciación de una señal positiva.

En la presente invención, la proporción entre el anticuerpo contra la proteína F del VSR y el anticuerpo contra la proteína N del VSR, no está particularmente limitada siempre que ambos anticuerpos estén presentes en la región de determinación. Preferentemente, la proporción del anticuerpo específico contra la proteína N es mayor que la proporción del anticuerpo específico contra la proteína F. La proporción de anticuerpo anti-proteína F con respecto al anticuerpo anti-proteína N, presente en la región de determinación (anticuerpo anti-proteína F/anticuerpo anti-proteína N), es preferentemente de 1/1 a 1/5, más preferentemente de 1/3 a 1/4.

La inmovilización del anticuerpo en el medio de cromatografía puede realizarse por adsorción física o unión química. En el caso de la adsorción física, el anticuerpo puede inmovilizarse aplicando una solución obtenida diluyendo el anticuerpo con una solución tampón o similar sobre el medio de cromatografía y secando la solución. La inmovilización del anticuerpo contra la proteína F y del anticuerpo contra la proteína N, puede realizarse aplicando uno de estos anticuerpos sobre el medio de cromatografía, secando el anticuerpo aplicado y después aplicando el otro anticuerpo sobre una región diferente o en la misma región. Como alternativa, la inmovilización del anticuerpo contra la proteína F y del anticuerpo contra la proteína N, puede realizarse mezclando previamente el anticuerpo
55 contra la proteína F y el anticuerpo contra la proteína N, en una proporción deseada, aplicando la mezcla en una posición deseada sobre el medio de cromatografía y secando la mezcla.

Después de formarse la región de determinación inmovilizando los anticuerpos sobre el medio de cromatografía, si fuera necesario, el medio de cromatografía puede someterse a un tratamiento de bloqueo para impedir que se produzca una reacción inespecífica. El tratamiento de bloqueo puede realizarse utilizando una proteína, tal como albúmina de suero bovino, leche desnatada, caseína o gelatina o un agente de bloqueo disponible en el comercio, tal como Fragmento Peptídico Bloqueante (fabricado por TOYOBO) o un polímero macromolecular hidrófilo.

La "parte de adición de muestra" del dispositivo de inmunocromatografía de acuerdo con la presente invención, es un lugar en el que se suministra un líquido de muestra que contiene una muestra y que se proporciona de tal manera que esté conectado al medio de cromatografía a través conductos capilares. El material de la parte de adición de
65

muestra no está particularmente limitado siempre que un líquido de muestra pueda desplazarse por acción capilar, pero generalmente se selecciona de materiales porosos, tales como rayón, cupra, papel de filtro y papel de filtro de fibra de vidrio, con el fin de que se consiga la adición de la muestra.

5 La "parte de absorción" del dispositivo de inmunocromatografía de acuerdo con la presente invención, es un lugar en el que se absorbe una muestra y un reactivo de marcaje. Un líquido de muestra suministrado a la parte de adición de muestra pasa a través de la región de determinación del medio de cromatografía y se absorbe en la parte de absorción. El material de la parte de absorción no está particularmente limitado siempre que un exceso de muestra y reactivo de marcaje pueda absorberse rápidamente, y se seleccione de materiales porosos, tales como, celulosa, 10 papel de filtro, y papel de filtro de fibra de vidrio, con el fin de que se consiga la parte de absorción. La parte de absorción se proporciona de tal manera que esté conectada al medio de cromatografía a través de conductos capilares.

15 El dispositivo de cromatografía de acuerdo con la presente invención, incluye esencialmente el medio de cromatografía, la parte de adición de muestra y la parte de absorción, pero adicionalmente puede incluir una lámina de apoyo para mejorar la manipulabilidad. La lámina de apoyo da soporte al medio de cromatografía, lo que facilita la manipulación del medio de cromatografía al que se conecta la parte de adición de muestra y la parte de absorción. El material de la lámina de apoyo no está particularmente limitado siempre que dicha lámina pueda conseguir este propósito, pero en general, preferentemente se utiliza un plástico incoloro o blanco.

20 En el dispositivo de cromatografía de acuerdo con la presente invención, un antígeno de proteína F y/o un antígeno de proteína N contenidos en una muestra se captura(n) en la región de determinación mediante el anticuerpo anti-proteína F y el anticuerpo anti-proteína N inmovilizados en la región de determinación. Estos antígenos capturados en la región de determinación se unen adicionalmente a un reactivo de marcaje de tal manera que su presencia se 25 visualiza.

30 El "reactivo de marcaje" utilizado en la presente invención incluye un anticuerpo que se une específicamente a la proteína F y/o un anticuerpo que se une específicamente a la proteína N y una sustancia de marcaje. El reactivo de marcaje utilizado en la presente invención permite que un antígeno de proteína F y un antígeno de proteína N que están contenidos en una muestra, se unan indirectamente a la sustancia de marcaje a través del anticuerpo.

35 El anticuerpo que puede utilizarse para el reactivo de marcaje utilizado en la presente invención no está particularmente limitado siempre que el anticuerpo pueda unirse a un antígeno de proteína F o a un antígeno de proteína N capturado por el anticuerpo anti-proteína F y el anticuerpo anti-proteína N inmovilizado en la región de determinación. Por ejemplo, puede utilizarse un anticuerpo policlonal específico del VSR o un anticuerpo policlonal o monoclonal específico de proteína F o de proteína N, pero preferentemente se utiliza un anticuerpo monoclonal específico de proteína F y un anticuerpo monoclonal específico de proteína N. Más preferentemente, se utiliza un anticuerpo monoclonal específico de proteína F y un anticuerpo monoclonal específico de proteína N que reconoce 40 respectivamente un epítipo diferente del epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal respectivo inmovilizado en la región de determinación. La sustancia de marcaje que puede utilizarse para el reactivo de marcaje utilizado en la presente invención no está particularmente limitada siempre que la sustancia de marcaje pueda generar una señal visible en un estado en el que la sustancia de marcaje se une indirectamente a la región de determinación a través del antígeno y el anticuerpo. Sin embargo, en general, preferentemente se utiliza una enzima o un transportador insoluble. Los ejemplos de enzimas que pueden utilizarse como sustancia de marcaje incluyen fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, ureasa y glucosa oxidasa. La enzima se utiliza en combinación con un sustrato que se transforma en un producto coloreado. El transportador insoluble que puede utilizarse como sustancia de marcaje no está particularmente limitado siempre que el transportador insoluble esté coloreado y tenga un diámetro de partícula que permita que se desplace en el medio de cromatografía poroso por acción capilar. Los 45 ejemplos de transportador insoluble incluyen partículas metálicas coloidales, partículas de óxidos metálicos coloidales, partículas no metálicas coloidales y partículas de látex. Preferentemente, se utilizan partículas metálicas coloidales que tienen un diámetro de partícula promedio de 1 nm a 500 nm, y más preferentemente se utilizan partículas de oro coloidal que tienen un diámetro de partícula promedio de 40 nm a 100 nm.

50 El reactivo de marcaje utilizado en la presente invención puede producirse conectando, mediante un método conocido tal como adsorción física o unión química, el anticuerpo que se une específicamente a la proteína F o a la proteína N, con la sustancia de marcaje. Por ejemplo, un reactivo de marcaje que incluye un anticuerpo y partículas de oro coloidal puede prepararse de la siguiente manera. A una solución en la que se suspenden coloidalmente partículas de oro, se añade un anticuerpo para adsorber físicamente el anticuerpo a las partículas de oro, y después se añade a la misma una solución de albúmina de suero bovino, el agente bloqueante descrito anteriormente, o 60 similar, para bloquear la superficie de las partículas con las que el anticuerpo no se ha puesto en contacto.

65 Cuando se utiliza como anticuerpo un anticuerpo monoclonal contra la proteína F y un anticuerpo monoclonal contra la proteína N, estos anticuerpos pueden mezclarse previamente en una proporción deseada y después pueden conectarse con las partículas de oro coloidal. El reactivo de marcaje producido de esta manera puede unirse tanto a la proteína F como a la proteína N capturadas en la región de determinación. Como alternativa, dos o más tipos de partículas de oro diferentes en el anticuerpo conectado a las mismas pueden mezclarse en una proporción deseada,

lo que también posibilita producir un reactivo de marcaje que pueda unirse a la proteína F y a la proteína N. Se prefiere el último método de producción porque la proporción entre el anticuerpo anti-proteína F y el anticuerpo anti-proteína N contenido en el reactivo de marcaje puede controlarse estrictamente. La proporción entre el anticuerpo anti-proteína F y el anticuerpo anti-proteína N contenido en el reactivo de marcaje no está particularmente limitada, pero es preferentemente la misma que la proporción entre estos anticuerpos presentes en la región de determinación.

En una realización de la presente invención, el reactivo de marcaje se mantiene en un estado seco en la parte de contención del reactivo de marcaje proporcionada en el dispositivo de inmunocromatografía. En la presente invención, la parte de contención del reactivo de marcaje puede proporcionarse entre la parte de adición de muestra y la región de determinación en el dispositivo de inmunocromatografía. El reactivo de marcaje mantenido en la parte de contención del reactivo de marcaje se disuelve en un líquido de muestra suministrado al dispositivo de cromatografía y pasa a través de la región de determinación junto con un antígeno del VRS contenido en una muestra.

En la presente invención, el material de la parte de contención del reactivo de marcaje no está particularmente limitado siempre que el reactivo de marcaje pueda mantenerse en un estado seco y la parte de contención del reactivo de marcaje puede proporcionarse de manera que esté conectada al medio de cromatografía a través de conductos capilares. Los ejemplos de dicho material incluyen papel de filtro de celulosa, papel de filtro de fibra de vidrio y tela de nailon no tejida. La parte de contención del reactivo de marcaje puede contener un azúcar tal como sacarosa, sucrosa, trehalosa, maltosa o lactosa o un alcohol de azúcar tal como manitol para mejorar la resolubilidad del reactivo de marcaje.

En otra realización de la presente invención, el reactivo de marcaje se incluye en un kit de ensayo en forma de solución como un componente distinto al dispositivo de cromatografía. La solución de reactivo de marcaje puede suministrarse al dispositivo de cromatografía de cualquier manera siempre que el reactivo de marcaje pueda pasar a través de la región de determinación junto con un antígeno del VRS en una muestra. La solución de reactivo de marcaje también puede suministrarse de cualquier manera siempre que el reactivo de marcaje pueda unirse al antígeno del VRS sin interferir con la captura del antígeno del VRS por el anticuerpo inmovilizado en la región de determinación. Por ejemplo, la solución de reactivo de marcaje puede mezclarse con un líquido de muestra y después suministrarse a la parte de adición de muestra del dispositivo de inmunocromatografía, o la solución de reactivo de marcaje puede suministrarse a la parte de adición de muestra después de suministrar un líquido de muestra.

La "muestra" que se aplica a la presente invención para determinar si contiene el VRS, no está particularmente limitada siempre que la muestra sea una muestra biológica líquida que se sospecha que contiene VRS. Como ejemplos preferidos de dicha muestra se incluyen frotis nasal, frotis faríngeo, aspirado nasal, exudado nasal y lavado nasal.

Cuando se realiza una determinación de si el VRS está presente en una muestra de frotis nasal, frotis faríngeo, aspirado nasal, exudado nasal o lavado nasal, de acuerdo con la presente invención, dicha muestra líquida puede suministrarse directamente al dispositivo de inmunocromatografía y revelarse en el mismo. Sin embargo, para facilitar su desplazamiento en el medio de cromatografía, dicha muestra altamente viscosa puede diluirse con un diluyente de muestra antes de suministrarse. En la presente invención, "líquido de muestra" significa un líquido de muestra en sí mismo o una muestra diluida con un diluyente de muestra.

El "diluyente de muestra" utilizado en la presente invención puede prepararse añadiendo al agua, que se utiliza como disolvente, una sal y un agente tamponante para ajustar el pH. Además, al diluyente de muestra, se le puede añadir un tensioactivo y un polímero hidrosoluble basado en vinilo con el fin de mejorar la fluidez de una muestra y reducir una reacción inespecífica resultante de un componente distinto del VRS contenido en una muestra.

La sal que se utiliza en el diluyente de muestra utilizado en la presente invención, no está particularmente limitada siempre que la sal se obtenga por una reacción entre un ácido y una base. Como ejemplos de dicha sal se incluyen sales inorgánicas de metales alcalinos tales como cloruro de sodio y cloruro de potasio. Preferentemente se utiliza cloruro de sodio.

El agente tamponante que se utiliza en el diluyente de muestra utilizado en la presente invención, no está particularmente limitado siempre que el pH de la solución pueda mantenerse constante incluso cuando se añade una muestra, pero es preferentemente uno que pueda mantener el pH en el intervalo de 7 a 11. Por ejemplo, se utiliza un fosfato, un citrato, un borato, un agente tamponante Tris o un agente tamponante de Good.

El tensioactivo que se utiliza en el diluyente utilizado en la presente invención, es preferentemente un tensioactivo no iónico, más preferentemente un tensioactivo no iónico que tiene un equilibrio hidrófilo-lipófilo (valor HLB, acrónimo de Hydrophilic - Lipophilic Balance) de 13 a 18, incluso más preferentemente un tensioactivo basado en polioxi-etileno que tiene un valor HLB de 13 a 18. Como ejemplos preferidos de tensioactivo se incluyen alquiléteres de polioxi-etileno, ésteres de ácidos grasos de polioxi-etileno sorbitán (marca comercial de la serie "Tween"), p-t-

octilfenil éteres de polioxietileno (nombre comercial de la serie "Tritón") y p-t-nonilfenil éteres de polioxietileno (nombre comercial de la serie "Triton N"). Estos tensioactivos pueden utilizarse individualmente o en combinación de dos o más de ellos. El contenido del tensioactivo no iónico del diluyente de muestra no está particularmente limitado, pero está en el intervalo del 0,01 al 10,0 % en peso, preferentemente en el intervalo del 0,1 al 5 % en peso, más preferentemente en el intervalo del 0,1 al 1,0 % en peso, incluso más preferentemente en el intervalo del 0,3 al 10 % en peso, del peso total del diluyente de muestra.

El polímero hidrosoluble basado en vinilo que se utiliza para el diluyente utilizado en la presente invención, es preferentemente un polímero hidrosoluble basado en vinilo que tiene un grupo polar que contiene un átomo de oxígeno y un átomo de nitrógeno y como ejemplos de los mismos se incluyen polímeros que tienen una unidad estructural obtenida por escisión del doble enlace de un monómero basado en vinilo, tal como acrilamida, metacrilamida, dimetilacrilamida, dimetilmetacrilamida o vinilpirrolidona. El polímero hidrosoluble basado en vinilo utilizado en la presente invención puede ser uno copolimerizado, por ejemplo, con 50 % mol o menor, preferentemente 30 % mol o menor, en particular, preferentemente 15 % mol o menor de un monómero basado en vinilo que tiene un grupo polar que contiene un átomo de oxígeno, tal como alcohol vinílico, acetato de vinilo o alquil acrilato. Como ejemplos específicos preferidos del polímero hidrosoluble basado en vinilo utilizado en la presente invención se incluyen polímeros no iónicos tales como copolímeros de polivinilpirrolidona, dimetilacrilamida/vinilpirrolidona (cuya proporción de copolimerización de dimetilacrilamida es de 50 % mol o menor), copolímeros de alcohol vinílico/vinilpirrolidona (cuya proporción de copolimerización de alcohol de vinilo es de 50 % mol o menor) y copolímeros de acetato de vinilo/vinilpirrolidona (cuya proporción de copolimerización de acetato de vinilo es de 20 % mol o menor). Estos polímeros hidrosolubles basados en vinilo tienen un peso molecular de 10.000 a 1.000.000, preferentemente de 100.000 a 1.000.000, más preferentemente de 200.000 a 500.000. El contenido del polímero hidrosoluble basado en vinilo del diluyente de muestra no está particularmente limitado, pero está en el intervalo de 0,01 a 5,0 % en peso, preferentemente en el intervalo de 0,1 a 2,0 % en peso del peso total del diluyente de muestra.

El diluyente de muestra es preferentemente una solución acuosa que contiene de 0,1 a 1 % en peso de un tensioactivo no iónico, de 0,05 a 0,2 M de una sal inorgánica metálica alcalina, un agente tamponante con un pH de 7 a 11 y de 0,1 a 1 % en peso de un polímero hidrosoluble basado en vinilo. Más preferentemente, el diluyente de muestra es una solución acuosa que contiene de 0,1 a 1 % en peso de un tensioactivo no iónico con un valor HLB de 13 a 18, de 0,05 a 0,2 M de una sal inorgánica metálica alcalina, un agente tamponante Tris, o un agente tamponante de Good con un pH de 7 a 11 y de 0,1 a 1 % en peso de un polímero hidrosoluble basado en vinilo que tiene un grupo polar que contiene un átomo de nitrógeno y un átomo de oxígeno.

En la presente invención, el diluyente de muestra puede utilizarse para diluir una muestra viscosa que contiene sólidos, tal como un frotis nasal. La solución de una muestra con el diluyente de muestra impide la obstrucción del medio de cromatografía con la muestra y facilita el desplazamiento de la muestra. Además, también puede impedirse la adsorción inespecífica de componentes disueltos en la muestra al medio de cromatografía.

En la presente invención, el diluyente de muestra también puede utilizarse como un revelador para revelar una muestra que tiene un volumen de líquido pequeño. Cuando el volumen de líquido de una muestra es pequeño y por lo tanto la muestra suministrada a la parte de adición de muestra no alcanza la parte de absorción, el diluyente de muestra utilizado en la presente invención se suministra adicionalmente para permitir que la muestra pase a través de la región de determinación y alcance la parte de absorción con fiabilidad.

El diluyente de muestra se incluye en un kit de ensayo de acuerdo con la presente invención junto con el dispositivo de inmunocromatografía.

El kit de ensayo para detectar VRS de acuerdo con la presente invención, incluye al menos el dispositivo de inmunocromatografía y el diluyente de muestra, y opcionalmente incluye la solución de reactivo de marcaje.

Si es necesario, el kit de ensayo de acuerdo con la presente invención, puede incluir adicionalmente una herramienta de recogida de muestra, un filtro de muestra, un control positivo y un control negativo. La herramienta de recogida de muestra puede seleccionarse apropiadamente dependiendo de las propiedades de una muestra, por ejemplo, un bastoncillo de algodón estéril. El filtro de muestra se utiliza, por ejemplo, para eliminar por filtración sólidos de una propia muestra recogida o de una muestra diluida con el diluyente de muestra.

A continuación en el presente documento, se describirán los principios de la detección del VRS de acuerdo con la presente invención.

Cuando un líquido de muestra que contiene un antígeno de VRS se suministra a la parte de adición de muestra del dispositivo de inmunocromatografía, el líquido de muestra alcanza el medio de cromatografía mediante acción capilar y se desplaza en el medio de cromatografía.

El líquido de muestra se mezcla con la solución de reactivo de marcaje antes de suministrar el líquido de muestra, o el reactivo de marcaje contenido en la parte de contención de reactivo de marcaje se disuelve el líquido de muestra,

o la solución de reactivo de marcaje se suministra después de que el líquido de muestra se suministre de tal manera que el antígeno de VRS contenido en el líquido de muestra se une al reactivo de marcaje.

5 El antígeno de VRS pasa a través de la región de determinación del medio de cromatografía junto con el reactivo de marcaje. El antígeno de VRS se captura en la región de determinación por el anticuerpo anti proteína F inmovilizado o por el anticuerpo anti proteína N, a través del contacto entre el líquido de muestra y el anticuerpo.

10 El exceso de muestra y el reactivo de marcaje adicionalmente se mueven en el medio de cromatografía y después se absorben en la parte de absorción.

15 Cuando una muestra contiene un antígeno de VRS, un antígeno de proteína F y/o un antígeno de proteína N que se une al reactivo de marcaje se captura(n) en la región de determinación de tal manera que aparece una señal visible en la región de determinación. Es decir, la aparición de una señal clara en la región de determinación significa que la muestra contiene VRS y la muestra se determina como positiva.

20 Por otro lado, cuando una cantidad suficiente de antígeno de VRS que se une al reactivo de marcaje no se captura en la región de determinación, no aparece señal en la región de determinación. Esto generalmente significa que una muestra no contiene VRS o que la cantidad de VRS contenida en una muestra está por debajo del límite de detección. En este caso, la muestra se determina como negativa.

A continuación se ilustra el procedimiento específico de un método de detección del VRS de acuerdo con la presente invención.

25 (1) A un dispositivo de inmunocromatografía se le suministra un líquido de muestra en el que al menos un anticuerpo que se une específicamente a la proteína F del VRS y al menos un anticuerpo que se une específicamente a la proteína N del VRS, se inmovilizan en una región de determinación.

(2) Al dispositivo de inmunocromatografía se le suministra una solución de reactivo de marcaje simultáneamente con o después de suministrar el líquido de muestra.

30 (3) Se permite que una muestra pase a través de la región de determinación junto con un reactivo de marcaje para poner la muestra en contacto con el anticuerpo inmovilizado en la región de determinación.

(4) La región de determinación se observa para detectar la coloración causada por el reactivo de marcaje.

(5) Cuando la coloración se detecta, la muestra se determina como "positiva a VRS", y cuando la coloración no se detecta la muestra se determina como "negativa a VRS".

35 Debe observarse que el líquido de muestra en el proceso 1 puede prepararse diluyendo una muestra con un diluyente de muestra. Además, el proceso 2 es opcional y puede omitirse cuando, por ejemplo, el dispositivo de inmunocromatografía incluye una parte de contención de reactivo de marcaje.

40 La detección de VRS contenido en una muestra puede realizarse de acuerdo con el procedimiento anterior. Particularmente, cuando la detección de VRS se realiza de acuerdo con el procedimiento anterior, una tasa de detección de virus puede aumentarse significativamente en comparación con cuando se utiliza un método de ensayo inmunocromatográfico convencional.

45 A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá más específicamente con referencia a los ejemplos, pero sin limitarse a estos ejemplos.

Ejemplos

(Ejemplo 1)

50 (1) Preparación de anticuerpo monoclonal anti-VRS.

Ratones BALB/c se inmunizaron con una cepa de VRS purificada o con células infectadas por VRS. Para determinar si el título del anticuerpo contra la proteína F o proteína N del VRS aumentaba, se extrajeron muestras de sangre de los ratones. Se extrajo el bazo de cada uno de los ratones que tenía títulos de anticuerpo aumentados, y se fusionaron esplenocitos con células de mieloma de ratón mediante un método propuesto por Kohler et al. (Kohler et al., Nature, vol, 256, págs. 495 a 497 (1975)).

60 Las células fusionadas (hibridomas) obtenidas de esta manera, se cultivaron en una incubadora a 37 °C, y los títulos de anticuerpo en los sobrenadantes de cultivo se determinaron por ELISA utilizando placas en las que se inmovilizó el antígeno de proteína F o el antígeno de proteína N del VRS. Se seleccionaron los hibridomas cuyo sobrenadante de cultivo tenía títulos de anticuerpo aumentados contra una proteína F o proteína N procedente de cada uno de los subtipos A y B del VRS. Además, los hibridomas se purificaron (se clonaron individualmente) por clonación.

65 Los hibridomas productores de anticuerpos clonados individualmente se inyectaron en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c tratados con pristano, y después de aproximadamente dos semanas, se recogió la ascitis que

contenía los anticuerpos. La IgG se purificó de la ascitis obtenida mediante purificación por afinidad, utilizando cromatografía de columna con proteína A (fabricada por Amersham) para obtener un anticuerpo monoclonal anti proteína F o un anticuerpo monoclonal anti proteína N.

5 (2) Preparación de la región de determinación del medio de cromatografía.

El anticuerpo monoclonal anti proteína F y el anticuerpo monoclonal anti proteína N preparados en el punto (1) anterior se mezclaron en una proporción en peso de 1:1 y se diluyó con una solución de tampón fosfato (pH 7,4) que contenía 5 % en peso de alcohol isopropílico para preparar una solución de anticuerpo que tiene una concentración de 0,5 mg/ml.

Se recubrió una membrana de nitrocelulosa de 25 x 2,5 cm (fabricada por Millipore, HF120) con la solución de anticuerpo utilizando un recubridor de anticuerpos (fabricado por BioDot), se secó a 50 °C durante 30 minutos y después se secó durante una noche a temperatura ambiente para preparar una región de determinación en el medio de cromatografía.

15 (3) Preparación de la solución de reactivo de marcaje

Se preparó una reacción de marcaje utilizando un anticuerpo anti proteína F o un anticuerpo anti proteína N obtenido de un clon diferente del clon que produjo el anticuerpo anti proteína F o el anticuerpo anti proteína N utilizado para la región de determinación.

El anticuerpo monoclonal anti proteína F o el anticuerpo monoclonal anti proteína N de 0,1 ml diluido con una solución tampón HEPES (pH 7,5) a una concentración de 0,1 mg/ml se añadió a 0,5 ml de una suspensión de oro coloidal (fabricada por Tanaka Kikinzoku Kogyo, diámetro de partícula promedio: 40 nm), y la mezcla resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después, se añadieron 0,1 ml de una solución tampón HEPES (pH 7,5) que contenía 10 % en peso de albumina de suero bovino, y la mezcla resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después, la mezcla se agitó suficientemente y se centrifugó a 8.000 xg durante 15 minutos para eliminar un sobrenadante.

Después, se añadieron 0,1 ml de una solución de tampón fosfato (pH 7,4) que contenía 1 % en peso de albumina de suero bovino para preparar una solución de reactivo de marcaje que contenía anticuerpo anti proteína F o una solución de reactivo de marcaje que contenía anticuerpo anti proteína N.

35 (4) Preparación del dispositivo de inmunocromatografía.

La solución de reactivo de marcaje que contenía el anticuerpo anti proteína F y la solución de reactivo de marcaje que contenía el anticuerpo anti proteína N preparada de esta manera, se mezclaron en una proporción de volumen de 1:1. La mezcla de solución de reactivo de marcaje resultante de 200 µl se mezcló con 100 µl de una solución de trehalosa acuosa al 25 % en peso, y la mezcla resultante se añadió homogéneamente a una almohadilla de fibra de vidrio de 16 mm x 100 mm (fabricada por Millipore) y se secó en un secador al vacío para preparar una parte de contención de reactivo de marcaje.

Después, el medio de cromatografía que tiene una región de determinación, la parte de contención de reactivo de marcaje y una almohadilla de muestra de fibra de vidrio que actúa como una parte de adición de muestra, y una almohadilla de absorción para absorber un exceso de muestra o una sustancia de marcaje, se conectaron a una lámina de apoyo de plástico. Después, el producto obtenido de esta manera se cortó con una cuchilla para que tuviese una anchura de 5 mm para producir un dispositivo de inmunocromatografía.

50 (5) Preparación del diluyente de muestra.

Se preparó una solución utilizando Tween 20 al 0,5 %, polivinilpirrolidona (PVP) K90 al 0,6 % (peso molecular de 360.000) y una solución tampón Tris (pH 8,0) que contenía albúmina de suero bovino al 1,0 % y cloruro de sodio 150 mm. La solución se utilizó como un diluyente de muestra para diluir una muestra, tal como un frotis nasal, frotis faríngeo, aspirado nasal, exudado nasal y lavado nasal.

55 (6) Medición

La presencia o ausencia de virus SR en una muestra se determinó de la siguiente manera utilizando el dispositivo de inmunocromatografía y el diluyente de muestra preparados anteriormente.

Se recogieron muestras de exudado nasal de personas infectadas con VRS y se diluyeron 10, 50 y 100 veces con el diluyente de muestra. Cada una de las muestras así preparadas de 120 µl se suministró en la almohadilla de muestra del dispositivo de inmunocromatografía y se reveló. Después de 10 minutos, la región de determinación se observó visualmente para establecer un juicio de acuerdo con los siguientes criterios:

65 +++: En la región de determinación podía observarse claramente una línea roja;

- ++: En la región de determinación podía observarse una línea roja;
- +: Podía observarse una línea roja pero este color era ligero; y
- : No podía observarse una línea roja.

5 Los resultados se muestran en la Tabla 1.

(Ejemplo comparativo 1)

(1) Preparación de la región de determinación del medio de cromatografía.

10 Se preparó una región de determinación en un medio de cromatografía de la misma manera que en el apartado (2) anterior del Ejemplo 1, excepto que solo se utilizó un anticuerpo monoclonal anti proteína F. El anticuerpo monoclonal anti proteína F utilizado procedía del mismo clon que el del anticuerpo utilizado en la región de determinación en el Ejemplo 1.

15 (2) Preparación del dispositivo de inmucromatografía

Se preparó una solución de reactivo de marcaje que solo contenía un anticuerpo anti proteína F de la misma manera que en el apartado (3) anterior del Ejemplo 1, y se preparó un dispositivo de inmunocromatografía de la misma manera que en apartado (4) anterior del Ejemplo 1.

(3) Medición

25 Las muestras se midieron de la misma manera que en el apartado (6) anterior del Ejemplo 1 utilizando el diluyente de muestra descrito en el apartado (5) anterior del Ejemplo 1. Los resultados se observan en la Tabla 1.

(Ejemplo comparativo 2)

(1) Preparación de la región de determinación del medio de cromatografía

30 Se preparó una región de determinación en un medio de cromatografía de la misma manera que en el apartado (2) anterior del Ejemplo 1, excepto que solo se utilizó el anticuerpo monoclonal anti proteína F. El anticuerpo monoclonal anti proteína F utilizado procedía de un clon diferente del clon que produjo el anticuerpo utilizado para la región de determinación en el Ejemplo 1.

35 (2) Preparación del dispositivo de inmunocromatografía

Se preparó una solución de reactivo de marcaje que solo contenía un anticuerpo anti proteína F de la misma manera que en el apartado (3) anterior del Ejemplo 1 y se preparó un dispositivo de inmucromatografía de la misma manera que en el apartado (4) anterior del Ejemplo 1.

(3) Medición

45 Las muestras se midieron de la misma manera que en el apartado (6) anterior del Ejemplo 1, utilizando el diluyente de muestra descrito en el apartado (5) anterior de la muestra del Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

(Ejemplo comparativo 3)

50 (1) Preparación de la región de determinación del medio de cromatografía

Se preparó una región de determinación en un medio de cromatografía de la misma manera que en el apartado (2) anterior del Ejemplo 1, excepto que solo se utilizó un anticuerpo monoclonal anti proteína N. El anticuerpo monoclonal anti proteína N utilizado procedía del mismo clon que el del anticuerpo utilizado en la región de determinación en el Ejemplo 1.

(2) Preparación del dispositivo de inmunocromatografía

60 Se preparó una solución de reactivo de marcaje que contenía solo un anticuerpo anti proteína N de la misma manera que en el apartado (3) anterior del Ejemplo 1, y se preparó un dispositivo de inmunocromatografía de la misma manera que en el apartado (4) anterior del Ejemplo 1.

(3) Medición

65 Las muestras se midieron de la misma manera que en el apartado (6) anterior del Ejemplo 1, utilizando el diluyente de muestra descrito en el apartado (5) anterior del Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la tabla 1.

(Ejemplo comparativo 4)

(1) Preparación de la región de determinación del medio de cromatografía

5 Se preparó una región de determinación en un medio de cromatografía de la misma manera que en el apartado (2) anterior del Ejemplo 1 excepto que solo se utilizó el anticuerpo monoclonal anti proteína N. El anticuerpo monoclonal anti proteína N utilizado procedía de un clon diferente del clon que produjo el anticuerpo utilizado para la región de determinación en el Ejemplo 1.

10 (2) Preparación del dispositivo de inmucromatografía

Se preparó una solución de reactivo de marcaje que solo contenía un anticuerpo anti proteína N de la misma manera que en el apartado (3) anterior del Ejemplo 1, y se preparó un dispositivo de inmucromatografía de la misma manera que en el apartado (4) anterior del Ejemplo 1.

15 (3) Medición

Las muestras se midieron de la misma manera que en el apartado (6) anterior del Ejemplo 1 utilizando el diluyente de muestra descrito en el apartado (5) anterior del Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

20

[Tabla 1]

Número de muestra	Tasa de dilución de muestra	Ejemplo 1	Ejemplo comparativo 1	Ejemplo comparativo 2	Ejemplo comparativo 3	Ejemplo comparativo 4
1	X10	+++	+	-	+++	+++
	X50	+	-	N.D	++	N.D
	X100	+	-	N.D	++	N.D
2	X10	+++	+++	+++	++	+
	X50	++	++	N.D	+	N.D
	X100	+	+	N.D	-	N.D

(Ejemplo 2)

25 Estudio de la proporción de anticuerpo en la región de determinación

(1) Preparación de la región de determinación del medio de cromatografía

30 Se preparó una región de determinación utilizando el mismo anticuerpo monoclonal anti proteína F y el anticuerpo monoclonal anti proteína N que se utilizó en el apartado (2) anterior en el Ejemplo 1. Más específicamente, se preparó una región de determinación de la misma manera que en el apartado (2) anterior del Ejemplo 1 excepto que la proporción de mezcla entre el anticuerpo anti proteína F (anticuerpo anti-PF) y el anticuerpo anti proteína N (anticuerpo anti-PN) se cambió a 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 y 1:5.

35 (2) Preparación del dispositivo de inmucromatografía.

40 Se preparó un reactivo de marcaje que contenía el anticuerpo anti proteína F y un reactivo de marcaje que contenía el anticuerpo anti proteína N de la misma manera que en el apartado (3) anterior en el Ejemplo 1. Estos reactivos se mezclaron en diferentes proporciones de mezcla de 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 y 1:5 para obtener soluciones mezcladas y utilizando cada una de las soluciones mezcladas, se produjo un dispositivo de inmucromatografía de la misma manera que en el apartado (4) anterior en el Ejemplo 1.

(3) Medición

45 Las muestras se midieron de la misma manera que en el apartado (6) anterior en el ejemplo 1 utilizando el diluyente de muestra descrito en el apartado (5) anterior en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Medición de la muestra 1 (dilución de muestra 50 veces)

50

[Tabla 2]

Proporción de anticuerpo en la región de determinación anticuerpo anti-PF/anticuerpo anti-PN	Proporción de anticuerpo en el reactivo de marcaje anticuerpo anti-PF/anticuerpo anti-PN					
	2/1	1/1	1/2	1/3	1/4	1/5
2/1	+	+	+	+	+	+
1/1	++	+	++	++	++	++
1/2	+	+	++	++	++	++
1/3	+	++	++	++	++	++
1/4	++	+	++	++	++	++
1/5	+	+	++	++	++	++

Medición de la muestra 2 (dilución de muestra 50 veces)

5

[Tabla 3]

Proporción de anticuerpo en la región de determinación anticuerpo anti-PF/anticuerpo anti-PN	Proporción de anticuerpo en el reactivo de marcaje anticuerpo anti-PF/anticuerpo anti-PN					
	2/1	1/1	1/2	1/3	1/4	1/5
2/1	+	+	+	+	+	+
1/1	++	++	+	+	+	+
1/2	++	++	+	+	+	+
1/3	++	++	++	++	++	++
1/4	++	++	++	++	++	++
1/5	++	++	++	++	+	+

De acuerdo con los resultados de los Ejemplos comparativos 3 y 4 mostrados en la Tabla 1, un antígeno de SRV está presente tanto en la muestra 1 como en la 2. Sin embargo, un antígeno de proteína F contenido en la muestra 2 se captura fácilmente por el anticuerpo anti proteína-F, mientras que un antígeno de proteína F contenido en la muestra 1 es difícil de capturar por el anticuerpo anti proteína-F. La proteína F contenida en una muestra varía en su facilidad de ser capturada en la región de determinación. Los resultados mostrados en las Tablas 2 y 3 indican que siempre puede obtenerse una señal positiva más fuerte cuando el anticuerpo anti proteína-F se inmoviliza en la región de determinación en combinación con el anticuerpo anti proteína-N que es más que el anticuerpo anti proteína F en la proporción de mezcla. Es decir, la inmovilización de una mayor cantidad del anticuerpo anti proteína N en la región de determinación hace que sea posible proporcionar un dispositivo de inmucromatografía capaz de conseguir una detección sensible independientemente de las propiedades de un antígeno de VRS contenido en una muestra.

Aplicabilidad industrial

De acuerdo con la presente invención, un anticuerpo que se une específicamente a la proteína F se utiliza en combinación con un anticuerpo que se une específicamente a la proteína N en una región de determinación, lo cual hace que sea posible proporcionar un dispositivo de inmucromatografía muy sensible capaz de aumentar significativamente una tasa de detección de VRS en comparación con un kit de ensayo inmucromatográfico convencional.

Por lo tanto, la presente invención es útil en el campo industrial de ensayos clínicos para infecciones por VRS y por lo tanto tiene aplicabilidad industrial.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de inmunocromatografía que comprende un medio de cromatografía que tiene una región de determinación en la que se inmoviliza al menos un anticuerpo que se une específicamente a una proteína F del virus respiratorio sincicial (VRS) y al menos un anticuerpo que se une específicamente a una proteína N del VRS.
5
2. El dispositivo de inmunocromatografía de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende esencialmente una parte de adición de muestra, el medio de cromatografía y una parte de absorción.
- 10 3. El dispositivo de inmunocromatografía de acuerdo con la reivindicación 2, que adicionalmente comprende una parte de contención del reactivo de marcaje.
4. El dispositivo de inmunocromatografía de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo que se une específicamente a la proteína F es al menos un anticuerpo que se une específicamente a una o a ambas de una proteína F del subgrupo A del VRS y una proteína F del subgrupo B del VRS.
15
5. Un kit de ensayo de inmunocromatografía para el VRS que comprende:
un dispositivo de inmunocromatografía de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un medio de cromatografía que tiene una región de determinación en la que se inmoviliza al menos un anticuerpo que se une específicamente a una proteína F del VRS y al menos un anticuerpo que se une específicamente a una proteína N del VRS; y un diluyente de muestra.
20
6. El kit de ensayo de inmunocromatografía para el VRS de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el dispositivo de inmunocromatografía incluye esencialmente una parte de adición de muestra, el medio de cromatografía y una parte de absorción.
25
7. El kit de ensayo de inmunocromatografía para el VRS de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el dispositivo de inmunocromatografía comprende adicionalmente una parte de contención del reactivo de marcaje.
- 30 8. El kit de ensayo de inmunocromatografía para el VRS de acuerdo con la reivindicación 6, que adicionalmente comprende una solución de reactivo de marcaje.
9. Uso de un dispositivo de inmunocromatografía que tiene una región de determinación en la que para detectar el VRS se inmoviliza al menos un anticuerpo que se une específicamente a una proteína F del virus respiratorio sincicial (VRS) y al menos un anticuerpo que se une específicamente a una proteína N del VRS.
35
10. Un método de inmunocromatografía para detectar el virus respiratorio sincicial (VRS), que comprende:
- 40 (a) suministrar un líquido de muestra que contenga una muestra, a un dispositivo de inmunocromatografía en el que en una región de determinación se inmoviliza al menos un anticuerpo que se une específicamente a una proteína F del VRS y al menos un anticuerpo que se une específicamente a una proteína N del VRS.
(b) permitir que el líquido de muestra suministrado en la etapa de (a) pase a través de la región de determinación junto con un reactivo de marcaje;
(c) poner en contacto el líquido de muestra que contiene el reactivo de marcaje, con los anticuerpos inmovilizados en la región de determinación; y
45 (d) determinar la muestra como "positiva al VRS" cuando se detecta coloración causada por el reactivo de marcaje.
11. El método de inmunocromatografía para detectar el VRS de acuerdo con la reivindicación 10, que adicionalmente comprende una etapa de dilución de la muestra con un diluyente de muestra, antes de que la muestra se suministre al dispositivo de inmunocromatografía.
50

FIG. 1

