

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 575**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2013 PCT/US2013/077541**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.07.2014 WO14107373**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2013 E 13870051 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 2941644**

54 Título: **Métodos para predecir el tiempo hasta el parto en una mujer embarazada**

30 Prioridad:

02.01.2013 US 201361748310 P
26.11.2013 US 201361909238 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.05.2020

73 Titular/es:

QIAGEN SCIENCES, LLC (100.0%)
19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874, US

72 Inventor/es:

AUSIELLO, ANTHONY;
SALINAS, RUBEN;
THOMPSON, MICHAEL;
MACKEY, DANIEL J.;
NARDOZZI, KAITLYN y
FRIEDMAN, MICHAEL

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 761 575 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

Métodos para predecir el tiempo hasta el parto en una mujer embarazada

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos para predecir el tiempo hasta el parto (TTD –“time-to-delivery”–) en pacientes embarazadas y/o para determinar el riesgo para una paciente de parto prematuro y/o de rotura espontánea de la membrana corioamniótica.

Antecedentes de la invención

10 La predicción del tiempo hasta el parto (TTD) es clínicamente importante en los embarazos con riesgo de parto prematuro, en particular por lo que respecta a la administración de corticosteroides (los cuales tienen un beneficio óptimo entre las 24 horas y los 7 días siguientes a la administración). Además, las pacientes con un elevado riesgo de nacimiento prematuro deben dar a luz en una unidad de atención terciaria. Es labor de los obstétricos predecir el TTD en pacientes con riesgo de parto prematuro, particularmente dada la controversia suscitada con respecto al uso prolongado de esteroides.

15 El Colegio Americano de Obstétricos y Ginecólogos (ACOG –“American College of Obstetricians and Gynecologists”–) indica, en su Boletín de Prácticas más reciente sobre el Tratamiento del Parto Prematuro, que, si bien se han propuesto y evaluado numerosas pruebas para identificar mujeres en riesgo de nacimiento prematuro, únicamente la ultrasonografía (para determinar la longitud cervical) y las pruebas de fibronectina fetal han demostrado ser beneficiosas. La ultrasonografía o las pruebas de fibronectina fetal, o una combinación de ambas, pueden ser de utilidad a la hora de identificar mujeres que se encuentran en un riesgo elevado de parto prematuro. Sin embargo, su
20 utilidad clínica puede radicar, fundamentalmente, en su capacidad para identificar las mujeres que tienen una menor probabilidad de dar a luz (es decir, el valor predictivo negativo (NPV –“negative predictive value”–) de la prueba), no las mujeres con una mayor probabilidad de dar a luz (esto es, una prueba con un elevado valor predictivo positivo (PPV –“positive predictive value”–)). Así, pues, existe la urgente necesidad de una prueba con un PPV elevado que prediga de una forma precisa un parto inminente y que permita una intervención oportuna. Lee et al. (J. Matern. Fetal Neonatal Med. 22:4) se refieren a la significación clínica de una prueba Amnisure positiva en mujeres en plazo de gestación normal y membranas intactas. Lee et al. (J. Matern. Fetal Neonatal Med. 25:9) se refieren a la significación
25 clínica de una prueba Amnisure positiva en mujeres con parto prematuro y membranas intactas.

Compendio de la invención

30 Como se ha explicado en lo anterior, lo que se necesita en la técnica son dispositivos y métodos mejorados para el diagnóstico preciso de pacientes con riesgo de parto inminente (por ejemplo, en 14 días, 7 días o 48 horas), particularmente en pacientes que presentan signos, síntomas o molestias que sugieren un parto prematuro (PTL –“preterm labor”–), pero que no tienen evidencia clínica de rotura de membranas fetales (ROM –“rupture of membranes”–). Tales dispositivos y métodos mejorados son de un valor significativo para los proveedores de servicios sanitarios a la hora de decidir el modo de tratar a sus pacientes, por ejemplo, a la hora de determinar si se han de
35 administrar tocolítics para prolongar la gestación, corticosteroides para mejorar el desarrollo respiratorio del feto, si se han de administrar antibióticos para reducir el riesgo de infección (intraparto y postparto), prescribir reposo en cama, y/o si se ha de aumentar la observación y la supervisión fetal.

40 La presente invención se refiere a un método para predecir el tiempo hasta el parto (TTD), de tal manera que el método comprende: (a) poner en contacto una muestra de fluido vaginal obtenida de una mujer embarazada, con al menos dos anticuerpos monoclonales específicos de PAMG-1 [placenta alfa microglobulina 1], de tal manera que uno de los anticuerpos se enlaza con PAMG-1 para formar un complejo PAMG-1 / anticuerpo monoclonal, el cual es entonces puesto en contacto con un segundo anticuerpo monoclonal inmovilizado, de tal manera que los anticuerpos monoclonales se enlazan simultáneamente a la molécula de PAMG-1; (b) detectar la presencia del complejo PAMG-1 / anticuerpo monoclonal en la muestra únicamente cuando la concentración de PAMG-1 en la muestra excede de un valor de umbral de detección predefinido de 4 ng/ml; y (c) predecir que la mujer embarazada dará a luz dentro de un intervalo de tiempo predeterminado si se detecta PAMG-1; o (d) predecir que la mujer embarazada no dará a luz dentro del intervalo de tiempo predeterminado si no se detecta PAMG-1; el cual comprende, de manera adicional, determinar que las membranas fetales de la mujer embarazada están intactas y seleccionar la mujer embarazada para análisis por medio del método únicamente si la mujer embarazada presenta lo siguiente: (i) signos, síntomas o molestias que sugieren un parto prematuro; y (ii) un tiempo de gestación comprendido entre 20 semanas y 36 semanas y 6 días.
50

55 La presente invención proporciona un método para predecir el tiempo hasta el parto (TTD), el cual incluye (por ejemplo, comprende, consiste esencialmente en, consiste en): (a) poner en contacto una muestra de fluido vaginal obtenida de una mujer embarazada, con al menos dos anticuerpos monoclonales específicos de PAMG-1, de tal manera que al menos uno de los anticuerpos se enlaza con la PAMG-1, cuando esta está presente en la muestra, para formar un complejo PAMG-1 / anticuerpo monoclonal; (b) detectar la presencia del complejo PAMG-1 / anticuerpo monoclonal en la muestra únicamente cuando la concentración de PAMG-1 en la muestra excede de un umbral de detección predefinido; y (c) predecir que la mujer embarazada dará a luz dentro de un intervalo de tiempo predeterminado si se

detecta PAMG-1. En otro aspecto, el método para predecir el TTD incluye: (a) poner en contacto una muestra de fluido vaginal obtenida de una mujer embarazada, con al menos dos anticuerpos monoclonales específicos de PAMG-1, de tal manera que al menos uno de los anticuerpos se enlaza con PAMG-1, cuando esta está presente en la muestra, para formar un complejo PAMG-1 / anticuerpo monoclonal; (b) detectar la presencia del complejo PAMG-1 / anticuerpo monoclonal en la muestra únicamente cuando la concentración de PAMG-1 en la muestra excede de un umbral de detección predefinido; y (c) predecir que la mujer embarazada dará a luz dentro de un intervalo de tiempo predeterminado si se detecta PAMG-1; o (d) predecir que la mujer embarazada no dará a luz dentro del intervalo de tiempo predeterminado si no se detecta PAMG-1. En algunas realizaciones, la etapa (d) comprende predecir que la mujer embarazada no dará a luz dentro del intervalo de tiempo predeterminado, en el instante en que se ha obtenido la muestra de fluido vaginal de la mujer embarazada. El intervalo de tiempo predeterminado para la predicción del TTD puede ser, por ejemplo, (i) dentro de aproximadamente 48 horas; (ii) dentro de aproximadamente 7 días; y/o (iii) dentro de aproximadamente 14 días. En ciertos aspectos, el método para predecir el TTD tiene uno o más de los siguientes valores predictivos positivos (PPVs –“predictive positive values”–): (i) al menos aproximadamente el 39% para la predicción del TTD dentro de 48 horas; (ii) al menos aproximadamente el 64% para la predicción del TTD dentro de 7 días; y (iii) al menos aproximadamente el 77% para la predicción del TTD dentro de aproximadamente 14 días. En ciertos aspectos, el método para predecir el TTD tiene uno o más de los siguientes PPVs: (i) aproximadamente el 45,5% para la predicción del TTD dentro de aproximadamente 48 horas; (ii) aproximadamente el 81,8% para la predicción del TTD dentro de aproximadamente 7 días; y (iii) aproximadamente el 90,9% para la predicción del TTD dentro de 14 días. En algunos aspectos, el método tiene un valor predictivo negativo (NPV –“negative predictive value”–) de más de aproximadamente el 90%. En ciertos aspectos, el método para predecir el TTD tiene uno o más de los siguientes PPVs: (i) aproximadamente el 45,5% para la predicción del TTD dentro de 48 horas; y/o (ii) aproximadamente el 78,3% (por ejemplo, aproximadamente el 78%) para la predicción del TTD dentro de 7 días; y/o (iii) aproximadamente el 87% para la predicción del TTD dentro de 14 días. En algunos aspectos, el método tiene un valor predictivo negativo (NPV) del 87% o mayor. En aún otros aspectos, el método tiene uno o más de los siguientes NPVs: (i) aproximadamente el 100% para la predicción del TTD dentro de 48 horas; y/o (ii) aproximadamente el 97,4% (por ejemplo, aproximadamente el 87%) para la predicción del TTD dentro de 7 días; y/o (iii) aproximadamente el 93,6% (por ejemplo, aproximadamente el 84%) para la predicción del TTD dentro de 14 días.

La presente invención proporciona un método para determinar el riesgo de parto prematuro, de tal manera que el método incluye (por ejemplo, comprende, consiste esencialmente en, consiste en): (a) poner en contacto una muestra de fluido vaginal obtenida de una mujer embarazada, con al menos dos anticuerpos monoclonales específicos de PAMG-1, de tal manera que al menos uno de los anticuerpos se enlaza con PAMG-1, cuando esta está presente en la muestra, para formar un complejo PAMG-1 / anticuerpo monoclonal; (b) detectar la presencia del complejo PAMG-1 / anticuerpo monoclonal en la muestra únicamente cuando la concentración de PAMG-1 en la muestra excede de un umbral de detección predefinido; y (c) predecir que la mujer embarazada está en riesgo de parto prematuro si se detecta PAMG-1. La presente invención proporciona un método para determinar el riesgo de parto prematuro, de tal manera que el método incluye (por ejemplo, comprende, consiste esencialmente en, consiste en): (a) poner en contacto una muestra de fluido vaginal obtenida de una mujer embarazada, con al menos dos anticuerpos monoclonales específicos de PAMG-1, de tal manera que al menos uno de los anticuerpos se enlaza con PAMG-1, cuando esta está presente en la muestra, para formar un complejo PAMG-1 / anticuerpo monoclonal; (b) detectar la presencia del complejo PAMG-1 / anticuerpo monoclonal en la muestra únicamente cuando la concentración de PAMG-1 en la muestra excede de un umbral de detección predefinido; y (c) predecir que la mujer embarazada está en riesgo de parto prematuro si se detecta PAMG-1; o (d) predecir que la mujer embarazada no está en riesgo de parto prematuro si no se detecta PAMG-1. La etapa (d) comprende predecir que la mujer embarazada no está en riesgo de parto prematuro en el momento en que se ha obtenido la muestra de fluido vaginal de la mujer embarazada.

La presente invención proporciona un método para determinar el riesgo para una mujer embarazada de rotura espontánea de las membranas corioamnióticas, de tal manera que el método incluye (por ejemplo, comprende, consiste esencialmente en, consiste en): (a) poner en contacto una muestra de fluido vaginal obtenida de una mujer embarazada, con al menos dos anticuerpos monoclonales específicos de PAMG-1, de tal manera que al menos uno de los anticuerpos se enlaza con PAMG-1, cuando esta está presente en la muestra, para formar un complejo PAMG-1 / anticuerpo monoclonal; (b) detectar la presencia del complejo PAMG-1 / anticuerpo monoclonal en la muestra únicamente cuando la concentración de PAMG-1 en la muestra excede de umbral de detección predefinido; y (c) determinar que la mujer embarazada está en riesgo de rotura espontánea de las membranas corioamnióticas si se detecta PAMG-1. La presente invención proporciona un método para determinar el riesgo para una mujer embarazada de rotura espontánea de las membranas corioamnióticas, de tal modo que el método incluye: (a) poner en contacto una muestra de fluido vaginal obtenida de una mujer embarazada, con al menos dos anticuerpos monoclonales específicos de PAMG-1, de tal manera que al menos uno de los anticuerpos se enlaza con PAMG-1, cuando esta está presente en la muestra, para formar un complejo PAMG-1 / anticuerpo monoclonal; (b) detectar la presencia del complejo PAMG-1 / anticuerpo monoclonal en la muestra únicamente cuando la concentración de PAMG-1 en la muestra excede de un umbral de detección predefinido; y (c) determinar que la mujer embarazada está en riesgo de rotura de las membranas corioamnióticas si se detecta PAMG-1; o (d) determinar que la mujer embarazada no está en riesgo de rotura de las membranas corioamnióticas si no se detecta PAMG-1. En ocasiones, la etapa (d) comprende predecir que la mujer embarazada no está en riesgo de rotura espontánea de las membranas corioamnióticas en el momento en que se ha obtenido la muestra de fluido vaginal de la mujer embarazada.

En ciertos aspectos, el método es para determinar el riesgo de rotura prematura espontánea, antes de tiempo, de las membranas corioamnióticas.

Se proporciona en esta memoria un método para descartar (predecir como altamente improbable) la ROM prematura espontánea, antes de tiempo, o el parto prematuro, para una mujer embarazada, dentro de un intervalo de tiempo predeterminado. El método puede incluir: (a) poner en contacto una muestra de fluido vaginal obtenida de una mujer embarazada de la que se sospecha que está en riesgo de parto prematuro, con al menos dos anticuerpos monoclonales específicos de PAMG-1, de tal manera que al menos uno de los anticuerpos se enlaza con PAMG-1, cuando esta está presente en la muestra, para formar un complejo PAMG-1 / anticuerpo monoclonal; (b) detectar la presencia del complejo PAMG-1 / anticuerpo monoclonal en la muestra únicamente cuando la concentración de PAMG-1 en la muestra excede de un umbral de detección predefinido; y (c) descartar (predecir como altamente improbable) la ROM prematura espontánea, antes de tiempo, o el parto prematuro dentro del intervalo de tiempo predeterminado, si no se detecta PAMG-1. El intervalo de tiempo predeterminado puede ser, por ejemplo, (i) dentro de aproximadamente 48 horas; (ii) dentro de aproximadamente 7 días; y/o (iii) dentro de aproximadamente 14 días. En algunos aspectos, el método para descartar (predecir como altamente improbable) la ROM prematura espontánea, antes de tiempo, o el parto prematuro tiene un valor predictivo negativo (NPV) de más de aproximadamente el 90%. El método para descartar (predecir como altamente improbable) la ROM prematura espontánea, antes de tiempo, o el parto prematuro tiene un valor predictivo negativo (NPV) del 87% o mayor. El método tiene uno o más de los siguientes NPVs: (i) aproximadamente el 100% para descartar (predecir como altamente improbable) la ROM prematura espontánea, antes de tiempo, o el parto prematuro dentro de 48 horas; y/o (ii) aproximadamente el 97,4% (por ejemplo, aproximadamente el 87%) para descartar (predecir como altamente improbable) la ROM prematura espontánea, antes de tiempo, o el parto prematuro dentro de 7 días; y/o (iii) aproximadamente el 93,6% (por ejemplo, aproximadamente el 84%) para descartar (predecir como altamente improbable) la ROM prematura espontánea, antes de tiempo, o el parto prematuro dentro de 14 días.

En cualquiera de los aspectos divulgados en lo anterior, el método puede incluir, adicionalmente, determinar que las membranas fetales de la mujer embarazada están intactas. El método puede incluir también seleccionar la mujer embarazada para el análisis con el método únicamente si la mujer embarazada presenta uno o más, dos o más, tres o más, o los cuatro de entre los siguientes puntos: (i) signos, síntomas o molestias que sugieren un parto prematuro; (ii) un tiempo de gestación comprendido entre 20 semanas y 36 semanas y 6 días; (iii) una longitud cervical de 25 mm o más; y (iv) una dilatación cervical de 3 cm o menos. El método puede también incluir recoger la muestra de fluido vaginal de la mujer embarazada con un dispositivo de recogida (por ejemplo, un hisopo mullido). En ciertos aspectos, el hisopo vaginal mullido proporciona una dilución al 1:4 de toda PAMG-1 presente en la muestra de fluido vaginal. En ciertos aspectos, el hisopo mullido proporciona una dilución de toda PAMG-1 presente en la muestra de fluido vaginal dentro de un intervalo entre 1:1 y 1:10. El método puede también incluir una cualquiera o más de las siguientes etapas: poner en contacto el dispositivo de recogida con un disolvente para liberar la muestra de fluido vaginal recogida; recoger la muestra de fluido vaginal a lo largo de un periodo de tiempo de aproximadamente 30 segundos; poner en contacto el dispositivo de recogida con el disolvente durante aproximadamente 30 segundos tras la recogida de la muestra de fluido vaginal; poner en contacto la muestra de fluido vaginal con los al menos dos anticuerpos monoclonales específicos de PAMG-1 durante 5 minutos.

En cualquiera de los anteriores aspectos, la magnitud umbral predeterminada de detección de PAMG-1 puede ser 4 ng/ml.

En cualquiera de los anteriores aspectos, los al menos dos anticuerpos monoclonales específicos de PAMG-1 pueden ser utilizados en un dispositivo de flujo lateral. El dispositivo de flujo lateral puede incluir una región de almohadilla y una región de ensayo. La región de almohadilla del dispositivo de ensayo puede incluir uno de los al menos dos anticuerpos monoclonales específicos de PAMG-1, y la región de ensayo puede incluir el otro de los dos. En ciertos aspectos, el anticuerpo monoclonal específico de PAMG-1 de la región de almohadilla es movilizable, y el anticuerpo monoclonal específico de PAMG-1 de la región de ensayo está inmovilizado. En algunos aspectos, la región de ensayo del dispositivo de ensayo incluye, de manera adicional, una región de control. En algunos aspectos, cada uno de los al menos dos anticuerpos monoclonales específicos de PAMG-1 es un anticuerpo seleccionado de entre el grupo consistente en M271, producido por el hibridoma N271, depositado con el Depositario de la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM) y con número de ingreso asignado VKPM-93; M52, producido por el hibridoma N52, depositado con la VKPM y con número de ingreso asignado VKPM-92; y M42, producido por el hibridoma N42, depositado con la VKPM y con número de ingreso asignado VKPM-94.

En cualquiera de los anteriores aspectos, el anticuerpo movilizable de la región de almohadilla puede ser M271, producido por el hibridoma N271, depositado con el Depositario de la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM) y con número de ingreso asignado VKPM-93; y el anticuerpo inmovilizado de la región de ensayo puede ser M52, producido por el hibridoma N52, depositado con la VKPM y con número de ingreso asignado VKPM-92.

En ciertos de los anteriores métodos que emplean un dispositivo, el dispositivo puede ser el dispositivo ilustrado en las Figuras 1 y 2.

La presente invención proporciona un juego o conjunto que incluye (por ejemplo, comprende, consiste esencialmente

en, consiste en): (a) un dispositivo para detectar la presencia de PAMG-1 en una muestra de fluido vaginal cuando está presente en una magnitud por encima de un umbral predeterminado; y un hisopo vaginal. El hisopo vaginal puede estar mullido. El conjunto incluye, de manera adicional, un vial y/o instrucciones para su uso. El umbral predeterminado es 4 ng/ml. El dispositivo incluye un primer y un segundo anticuerpos monoclonales específicos para PAMG-1. El primer y el segundo anticuerpos monoclonales específicos de PAMG-1 pueden tener diferentes especificidades de enlace y afinidades con la PAMG-1. Cada uno de los primer y segundo anticuerpos monoclonales específicos de PAMG-1 puede ser un anticuerpo seleccionado de entre el grupo consistente en M271, producido por el hibridoma N271, depositado con el Depositario de la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM) y con número de ingreso asignado VKPM-93; M52, producido por el hibridoma N52, depositado con la VKPM y con número de ingreso asignado VKPM-92; y M42, producido por el hibridoma N42, depositado con la VKPM y con número de ingreso asignado VKPM-94. El dispositivo de ensayo es un dispositivo de flujo lateral. El dispositivo de ensayo puede incluir una región de almohadilla y una región de ensayo. La región de almohadilla del dispositivo de ensayo puede incluir uno de los primer y segundo anticuerpos monoclonales específicos de PAMG-1, y la región de ensayo puede incluir el otro de los primer y segundo anticuerpos monoclonales específicos de PAMG-1. Una o ambas regiones de almohadilla y de ensayo pueden contener anticuerpos monoclonales específicos de PAMG-1 adicionales y/o mezclas de los dos primeros anticuerpos monoclonales específicos de PAMG-1. El anticuerpo monoclonal específico de PAMG-1 de la región de almohadilla puede ser movilizable, y el anticuerpo monoclonal específico de PAMG-1 de la región de ensayo puede estar inmovilizado. El anticuerpo movilizable de la región de almohadilla es el M271, producido por el hibridoma N271, depositado con el Depositario de la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM) y con número de ingreso asignado VKPM-93, y el anticuerpo inmovilizado de la región de ensayo es el M52, producido por el hibridoma N52, depositado con la VKPM y con número de ingreso asignado VKPM-92. La región de ensayo del dispositivo de ensayo incluye, adicionalmente, una región de control. El juego o conjunto puede estar destinado a utilizarse en un método para predecir el TTD. El conjunto puede estar destinado a utilizarse en un método para predecir el riesgo de parto prematuro. El conjunto puede estar destinado a utilizarse en un método para determinar el riesgo para una mujer embarazada de rotura espontánea de las membranas corioamnióticas (ROM) (por ejemplo, ROM prematura, antes de tiempo). En algunos aspectos, el dispositivo incluido en el conjunto es el dispositivo que se ilustra en las Figuras 1 y 2.

Definiciones

Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión 'tiempo hasta el parto (TTD)' es la duración total de tiempo (por ejemplo, horas, días, semanas), comenzando en un instante de tiempo de comienzo predeterminado (por ejemplo, el momento en que una paciente se presenta con signos potenciales de parto prematuro), hasta que la paciente embaraza da a luz su bebé. Puede especificarse el TTD como "dentro de un intervalo de tiempo predeterminado", tal como, por ejemplo, dentro de aproximadamente 14 días (o dentro de aproximadamente 7 días, o dentro de aproximadamente 48 horas) desde el instante en que se hizo la predicción. Tal y como se utiliza en esta memoria, la expresión 'predecir el TTD' significa determinar la probabilidad de alumbramiento dentro de un intervalo de tiempo predeterminado (por ejemplo, dentro de 2, 7 o 14 días). En ciertos aspectos, predecir el TTD incluye determinar que una ROM prematura espontánea, antes de tiempo, o un parto prematuro dentro del instante de tiempo predeterminado es altamente probable. En ciertos aspectos, predecir el TTD incluye descartar la ROM prematura espontánea, antes de tiempo, o el parto prematuro dentro del instante de tiempo predeterminado (es decir, determinar que la ROM prematura espontánea, antes de tiempo, o el parto prematuro dentro del instante de tiempo predeterminado es altamente improbable).

Tal y como se utiliza en esta memoria, la expresión 'parto prematuro' se define como un alumbramiento antes de las 37 semanas de tiempo de gestación.

Tal y como se utiliza en esta memoria, una mujer embarazada para la que se determina que está en "riesgo de parto prematuro" es una que se presenta con signos, síntomas o molestias que sugieren un parto prematuro.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, un 'umbral de detección predefinido' para una prueba divulgada en esta memoria es la magnitud (por ejemplo, concentración o cantidad) con la que, o por encima de la cual, un polipéptido u otra sustancia ha de estar presente en una muestra (por ejemplo, una muestra de fluido vaginal o cervicovaginal sin diluir) para ser detectada (es decir, para dar un resultado positivo en una prueba que se divulga en esta memoria (por ejemplo, una prueba de TTD)).

Tal y como se utiliza en esta memoria, el término 'anticuerpo' se refiere a cualquier polipéptido que tenga una afinidad de enlace para un antígeno (por ejemplo, la PAMG-1) según se especifica en esta memoria, independientemente del método que se utilice para obtener el polipéptido. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo, un anticuerpo policlonal o un fragmento del mismo para enlace con antígeno, o bien cualquier molécula que tenga una especificidad de enlace para un antígeno de objetivo o pretendido, tal y como se especifica en esta memoria.

Un 'antígeno' es una entidad (por ejemplo, una entidad proteínica o péptido) a la que se enlaza de forma específica una molécula enlazante.

El término 'epítipo' o la expresión 'determinante antigénico' se refiere a un lugar de un antígeno al que se enlaza de

forma específica una molécula enlazante (por ejemplo, un anticuerpo).

Tal y como se utiliza en esta memoria, un anticuerpo que es 'específico para' un antígeno (por ejemplo, la PAMG-1) se enlaza a ese antígeno.

5 Tal y como se utiliza en esta memoria, una mujer embarazada es "adecuada para" o está "en necesidad de predicción del TTD" de acuerdo con los métodos divulgados en esta memoria si cumple con criterios predefinidos según se ha divulgado en la presente memoria, tales como la presentación de signos, síntomas o molestias que sugieren el parto, pero sin tener una rotura clínicamente detectable de membranas (ROM) (por ejemplo, pérdidas de fluido del os cervical, acumulación de fluido en el fórnix posterior), si bien no están limitados por estos.

10 El término 'aproximadamente', tal y como se utiliza en esta memoria, significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular conforme se determina por una persona con conocimientos ordinarios de la técnica, el cual dependerá, en parte, de cómo se mida o determine el valor, es decir, de las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, 'aproximadamente' puede significar dentro de 1 o más de 1 desviaciones típicas, en lo que respecta a la práctica de la técnica. De manera alternativa, 'aproximadamente' puede significar dentro de un intervalo de hasta el 20%, preferiblemente hasta el 10%, más preferiblemente hasta el 5% y, de la forma más preferida, incluso hasta el 15 1% de un valor dado. Alternativamente, en particular por lo que respecta a sistemas o procedimientos biológicos, el término puede significar dentro de un cierto orden de magnitud, preferiblemente dentro de 5 veces y, más preferiblemente, dentro de 2 veces, un valor. Cuando se describen valores particulares en la solicitud y en las reivindicaciones, a menos que se diga lo contrario, deberá suponerse que el término 'aproximadamente' significa dentro de un intervalo de error aceptable para ese valor particular.

20 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente se entiende por una persona con conocimientos ordinarios de la técnica a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, el presente documento, incluyendo las definiciones, prevalecerá.

25 Los materiales, métodos y ejemplos que se divulgan en esta memoria son únicamente ilustrativos y no es la intención que sean limitativos.

Los detalles de una o más realizaciones de la presente invención se establecen en los dibujos que se acompañan y en la descripción que sigue. En lo que sigue se describen métodos y materiales preferidos, si bien pueden utilizarse también métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en esta memoria, en la práctica o ensayo de la presente invención. Otras características, propósitos y ventajas de los métodos que se divulgan en la presente 30 memoria resultarán evidentes de la descripción y de los dibujos, así como de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una vista en corte longitudinal y esquemática, y la Figura 2 es una vista en planta, de un dispositivo proporcionado a modo de ejemplo que puede ser utilizado para detectar la presencia de PAMG-1 en una muestra de fluido vaginal (por ejemplo, para diagnosticar el tiempo hasta el parto (TTD –"time to delivery"–)). Los números 35 identifican los siguientes componentes del dispositivo proporcionado a modo de ejemplo: 10: región de anticuerpo M271; 12: almohadilla; 14: región de ensayo; 16: región de control; 18: flechas; 22: membrana de nitrocelulosa; 24: membrana de papel de filtro; 26: base de plástico rígido adhesivo; 28: película protectora parcialmente transparente y con flechas; y 30: película protectora no transparente.

Descripción detallada de la invención

40 A continuación, se describen diversos aspectos de la invención.

Visión general

La presente invención proporciona métodos mejorados para predecir el TTD dentro de un intervalo predeterminado de tiempo (por ejemplo, dentro de aproximadamente 14 días, 7 días o 48 horas). También se proporcionan métodos para determinar el riesgo de parto prematuro (esto es, un parto antes de un tiempo de gestación de 37 semanas), así 45 como métodos para determinar el riesgo para una mujer embarazada de rotura espontánea de las membranas corioamnióticas (ROM). En general, los métodos divulgados en esta memoria incluyen detectar la presencia de PAMG-1 cuando esta está presente en una magnitud por encima de un umbral de detección predefinido. Los métodos presentemente descritos pueden predecir el TTD y/o descartar el parto prematuro espontáneo con un elevado PPV y con un elevado NPV. Una prueba positiva de acuerdo con los métodos divulgados en esta memoria puede indicar que el parto es inminente (por ejemplo, dentro de aproximadamente 14 días, 7 días o 48 horas). Una prueba negativa (ausencia de detección de PAMG-1) indica que no es probable que se produzca el parto dentro de 14 días, 7 días o 50 48 horas. Una prueba positiva puede también indicar que una mujer embarazada está en riesgo de ROM prematura espontánea, antes de tiempo, y/o parto prematuro, en tanto que una prueba negativa indica que una mujer embarazada no está en riesgo de ROM prematura espontánea o parto prematuro. Así, pues, se proporcionan también métodos para descartar (predecir como altamente improbable) la ROM prematura espontánea, antes de tiempo, o el parto 55 prematuro.

La PAMG-1 es una proteína que se encuentra en altas concentraciones en el fluido amniótico, pero en muy bajas concentraciones en las magnitudes de fondo de la descarga cervicovaginal. En los últimos años, la comunidad médica ha venido aceptando cada vez más el uso generalizado de la detección de PAMG-1 con el fin de ayudar al proveedor a la hora de confirmar o descartar la rotura de las membranas fetales (ROM). El ensayo utilizado se comercializa en el mercado como la AmniSure® ROM Test (Prueba de ROM AmniSure®), fabricado por la AmniSure® International, LLC, Boston, MA [Massachussets], USA. En una investigación previa de la utilidad de la PAMG-1 para la detección de ROM, se apreció que en 20 de 23 casos en que la prueba de ROM de AmniSure® fue positiva y la evaluación clínica estándar (por ejemplo, nitracina, cristalización y retención de líquidos) fue negativa, se determinó en última instancia que la paciente había rompido aguas con un análisis retrospectivo de su curso clínico (véase la divulgación de Lee SM et al., *Obstet Gynecol* 2007; 109: 634-640). Se informó después de que, para la totalidad de las pacientes prematuras del grupo que mostraba signos y síntomas de parto, el alumbramiento se produjo dentro de un lapso 7 días (véase la divulgación de Lee SM et al., *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009; 22:305-310). Se investigó también el valor clínico de una prueba de ROM de AmniSure® positiva en la paciente que presenta signos y síntomas de parto prematuro (PTL), pero sin ROM. Los resultados demostraron que la Prueba de ROM de AmniSure® era predictiva de alumbramiento para estas pacientes dentro de 48 horas, 7 días y 14 días (véase la divulgación Lee MS et al., *J Matern Fetal Neonatal Med*, setiembre de 2012; 25(9): 1690-8), pero el PPV no fue óptimo.

Aunque no es la intención adscribirse a ninguna teoría o mecanismo de actuación particular, se cree que los presentes métodos proporcionan un comportamiento superior, tal como, por ejemplo, en cuanto a PPV y NPV, así como sensibilidad (SN –“sensitivity”–) y especificidad (SP –“specificity”–), al menos en parte, al proporcionar una prueba de diagnóstico que tiene una sensibilidad incrementada para la detección PAMG-1 en muestras de secreción vaginal, en comparación con ciertos métodos de diagnóstico actualmente disponibles. Por ejemplo, si bien las pruebas actualmente disponibles que detectan la PAMG-1 utilizan un umbral de detección de 5 ng/ml, se ha descubierto en la actualidad que, ajustando el umbral de detección en 4 ng/ml, se proporciona una prueba de diagnóstico sorprendentemente mejorada (por ejemplo, un alto PPV y un alto NPV). No era de esperar que pudiera utilizarse un umbral de detección de 4 ng/ml en un método para predecir el TTD con un alto PPV, tal como se describe en la presente memoria, ya que se esperaba que la disminución del umbral de detección por debajo de 5 ng/ml aumentaría la frecuencia de resultados positivos falsos, con lo que se reduciría el PPV de la prueba. Es más, no se constató anteriormente que la detección de concentraciones de PAMG-1 por debajo de 5 ng/ml pudiera ser de utilidad a la hora de predecir el TTD, ya que se pensaba que concentraciones tan pequeñas serían de escaso significado clínico.

Se ha descubierto también en la actualidad que el tiempo de gestación ideal de una mujer embarazada a la hora de predecir el TTD de acuerdo con los métodos divulgados en la presente memoria, es específicamente entre 20 semanas y 36 semanas y 6 días, a fin de garantizar el más alto grado de precisión del método de diagnóstico. Asimismo, en ciertas realizaciones, la prueba de TTD que se divulga en esta memoria tiene un elevado NVP y un elevado PPV, así como unas elevadas SN y SP, para la población de pacientes que tiene una dilatación cervical de 3 cm o menos.

En ciertas realizaciones, una mujer embarazada es apta, y/o se selecciona, para la predicción del TTD si tiene un tiempo de gestación de entre 20 semanas y 36 semanas y 6 días. En ciertas realizaciones, una mujer embarazada es apta, y/o se selecciona, para la predicción del TTD si tiene una longitud cervical de 25 mm o más y/o una dilatación cervical de 3 cm o menos.

En una prueba diagnóstica, el PPV, o índice de precisión, es la proporción de resultados de prueba positivos que son verdaderos positivos (tales como diagnósticos correctos). Se trata de una medida crucial para el comportamiento de un método de diagnóstico, ya que refleja la probabilidad de que una prueba positiva responda al estado subyacente que es objeto de la prueba. Otras medidas importantes incluyen el valor predictivo negativo (NPV), la sensibilidad (SN) y la especificidad (SP). El NPV indica la proporción de sujetos con un resultado de prueba negativo que son identificados correctamente como carentes del estado objeto de la prueba. Un elevado NPV para una prueba dada indica que, cuando la prueba arroja un resultado negativo, es, de la manera más probable, correcta en su determinación, y solo rara vez produce un resultado negativo falso. De esta forma, a la hora de predecir un parto inminente (por ejemplo, dentro de un intervalo de tiempo específico), un NPV elevado significa que la prueba tan solo raramente predice que el parto no es inminente cuando, en realidad, sí lo es. El número de resultados positivos verdaderos y el de resultados negativos verdaderos que arroja una prueba de diagnóstico (por ejemplo, en un estudio clínico) puede ser también combinado para determinar la sensibilidad (SN) y la especificidad (SP) de una prueba diagnóstica.

El PPV puede calcularse de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$PPV = \frac{\text{número de positivos verdaderos}}{\text{número de positivos verdaderos} + \text{número de positivos falsos}}$$

El NPV puede ser calculado de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$NPV = \frac{\text{número de negativos verdaderos}}{\text{número de negativos verdaderos} + \text{número de negativos falsos}}$$

La SN puede calcularse de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$SN = \frac{\text{número de positivos verdaderos}}{\text{número de positivos verdaderos} + \text{número de negativos falsos}}$$

La SP puede calcularse de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$SP = \frac{\text{número de negativos verdaderos}}{\text{número de negativos verdaderos} + \text{número de positivos falsos}}$$

5 En ciertos aspectos, los métodos divulgados en la presente memoria tienen un PPV de al menos aproximadamente el 77% para la predicción del TTD dentro de 14 días. En una realización específica, el PPV para predecir el TTD dentro de 14 días es aproximadamente el 90,9% (por ejemplo, aproximadamente el 91%). En otra realización específica, el PPV para predecir el TTD dentro de aproximadamente 14 días es aproximadamente el 87%. Ha de apreciarse que el presente método también abarca métodos para predecir el TTD dentro de aproximadamente 14 días que tienen un PPV de al menos aproximadamente, por ejemplo, el 75%, el 76%, el 78%, el 79%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100%. En ciertos aspectos, el PPV para predecir el TTD dentro de aproximadamente 14 días está comprendido en el intervalo entre aproximadamente el 70% y el 100%, entre aproximadamente el 80% y el 100%, entre aproximadamente el 85% y el 100%, o entre aproximadamente el 90% y el 100%.

15 Los métodos divulgados en la presente memoria tienen un PPV de al menos aproximadamente el 64% para la predicción del TTD dentro de aproximadamente 7 días. En una realización específica, el PPV para la predicción del TTD dentro de aproximadamente 7 días es el 81,8%. En otra realización específica, el PPV para la predicción del TTD dentro de aproximadamente 7 días es aproximadamente el 78,3% (por ejemplo, aproximadamente el 78%). Ha de apreciarse que los presentes métodos también abarcan métodos para predecir el TTD dentro de aproximadamente 7 días que tienen un PPV de al menos aproximadamente, por ejemplo, el 65%, el 66%, el 67%, el 68%, el 69%, el 70%, el 71%, el 72%, el 73%, el 74%, el 75%, el 76%, el 78%, el 79%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100%. En ciertos aspectos, el PPV para la predicción del TTD dentro de 7 días está comprendido en el intervalo entre aproximadamente el 60% y el 100%, entre aproximadamente el 65% y el 100%, entre aproximadamente el 70% y el 100%, entre aproximadamente el 75% y el 100%, o entre aproximadamente el 80% y el 100%.

25 En otros aspectos, los métodos divulgados en la presente memoria tienen un PPV para la predicción del TTD dentro de aproximadamente 48 horas de al menos aproximadamente el 39%. En una realización específica, el PPV para la predicción del TTD dentro de aproximadamente 48 horas es el 45,5%. Ha de apreciarse que los presentes métodos también abarcan métodos para predecir el TTD dentro de aproximadamente 48 horas que tienen un PPV de al menos aproximadamente, por ejemplo, el 40%, el 41%, el 42%, el 43%, el 44%, el 45%, el 46%, el 47%, el 48%, el 49%, el 50%, el 51%, el 52%, el 53%, el 54%, el 55%, el 56%, el 57%, el 58%, el 59%, el 60%, el 61%, el 62%, el 63%, el 64%, el 65%, el 66%, el 67%, el 68%, el 69%, el 70%, el 71%, el 72%, el 73%, el 74%, el 75%, el 76%, el 77%, el 78%, el 79%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100%. En ciertos aspectos, el PPV para la predicción del TTD dentro de aproximadamente 48 horas utilizando los presentes métodos está comprendido en el intervalo entre aproximadamente el 39% y el 100%, entre aproximadamente el 40% y el 100%, o entre aproximadamente el 45% y el 100%.

40 En ciertos aspectos, el NPV para predecir el TTD de acuerdo con el método divulgado en la presente memoria es al menos aproximadamente el 90% (por ejemplo, aproximadamente el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% para la predicción del TTD dentro de aproximadamente 48 horas, 7 días o 14 días).

45 En ciertos aspectos, la SN para la predicción del TTD de acuerdo con el método divulgado en esta memoria es al menos aproximadamente el 70% (por ejemplo, al menos aproximadamente el 70%, el 71%, el 72%, el 73%, el 74%, el 75%, el 76%, el 77%, el 78%, el 79%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100%) para la predicción del TTD dentro de aproximadamente 48 horas, 7 días o 14 días.

50 En ciertos aspectos, la SP para la predicción del TTD de acuerdo con el método divulgado en esta memoria es al menos aproximadamente el 70% (por ejemplo, al menos aproximadamente el 70%, el 71%, el 72%, el 73%, el 74%, el 75%, el 76%, el 77%, el 78%, el 79%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100%) para la predicción del TTD dentro de aproximadamente 48 horas, 7 días o 14 días.

55 En ciertas realizaciones, los presentes métodos proporcionan una prueba diagnóstica que tiene un PPV de aproximadamente el 90,9% y/o un NPV de aproximadamente el 93,6%, y/o una SN de aproximadamente el 80%, y/o una SP de aproximadamente el 97,3%, para la predicción del TTD dentro de aproximadamente 14 días. En ciertas realizaciones, los presentes métodos proporcionan una prueba diagnóstica que tiene un PPV de aproximadamente el 91%, y/o un NPV de aproximadamente el 94%, y/o una SN de aproximadamente el 80%, y/o una SP de aproximadamente el 97,3%, para la predicción del TTD dentro de aproximadamente 14 días.

5 En ciertas realizaciones, los presentes métodos proporcionan una prueba diagnóstica que tiene un PPV de aproximadamente el 87%, un NPV de aproximadamente el 93,6%, una SN de aproximadamente el 80%, y una SP de aproximadamente el 96,1% para la predicción del TDT dentro de aproximadamente 14 días. En ciertas realizaciones, los presentes métodos proporcionan una prueba diagnóstica que tiene un PPV de aproximadamente el 87% y/o un NPV de aproximadamente el 94%, y/o una SN de aproximadamente el 80%, y/o una SP de aproximadamente el 96%, para la predicción del TTD dentro de aproximadamente 14 días.

En ciertas realizaciones, los presentes métodos proporcionan una prueba diagnóstica que tiene un PPV del 81,8%, un NPV del 97,4%, una SN del 90% y una SP del 95%, para la predicción del TTD dentro de aproximadamente 7 días.

10 En ciertas realizaciones, los presentes métodos proporcionan una prueba diagnóstica que tiene un PPV de aproximadamente el 78,3% y/o un PNV de aproximadamente el 97,4%, y/o una SN de aproximadamente el 90%, y/o una SP de aproximadamente el 93,8%, para la predicción del TTD dentro de aproximadamente 7 días. En ciertas realizaciones, los presentes métodos proporcionan una prueba diagnóstica que tiene un PPV de aproximadamente el 78% y/o un PNV de aproximadamente el 97%, y/o una SN de aproximadamente el 90%, y/o una SP de aproximadamente el 94%, para la predicción del TTD dentro de aproximadamente 7 días.

15 En ciertas realizaciones, los presentes métodos proporcionan una prueba diagnóstica que tiene un PPV de aproximadamente el 45,5%, un NPV de aproximadamente el 100%, una SN de aproximadamente el 100% y una SP de aproximadamente el 86,7%, para la predicción del TTD dentro de aproximadamente 48 horas.

20 Debe entenderse que los valores e intervalos anteriores pueden ser ajustados de manera que incluyan intervalos de confianza (por ejemplo, intervalos de confianza del 95%), tal como se muestra en el Ejemplo 2 y en las Tablas 2 y 4 que se proporcionan más adelante.

25 Los métodos divulgados en esta memoria son también de utilidad a la hora de determinar el riesgo para una paciente (esto es, una mujer embarazada) de parto prematuro. Se define el parto prematuro, en esta memoria, como el parto antes de 37 semanas de tiempo de gestación. Una prueba positiva obtenida de acuerdo con los métodos que se divulgan en esta memoria (es decir, la detección de PAMG-1 en una magnitud en, o por encima de, un umbral de detección predefinido en una muestra de fluido vaginal) indica que una paciente está en riesgo de parto prematuro. En ciertas realizaciones, una paciente es seleccionada para la prueba de riesgo de parto prematuro si la paciente presenta uno o más de los siguientes signos: (i) un tiempo de gestación comprendido entre 20 semanas y 36 semanas y 6 días; y/o (ii) una longitud cervical de 25 mm o más; y/o (iii) una dilatación cervical de 3 cm o menos.

30 Los métodos divulgados en esta memoria son también de utilidad para determinar el riesgo para una mujer embarazada de rotura espontánea de las membranas corioamnióticas (ROM), tal como, por ejemplo, una ROM prematura, antes de tiempo. La ROM espontánea se produce, por lo común, como parte del proceso normal del parto. Sin embargo, puede también producirse una ROM prematura, antes de tiempo (por ejemplo, antes de llegar a las 37 semanas de tiempo de gestación). Resulta ventajoso tener la posibilidad de determinar si una paciente está en riesgo de ROM espontánea, incluyendo una ROM prematura, antes de tiempo, de manera que puedan adoptarse medidas de intervención apropiadas (por ejemplo, administración de tocolíticos con el fin de prolongar la gestación, de corticosteroides para mejorar el desarrollo respiratorio del feto, administración de antibióticos para reducir el riesgo de infección (intraparto y postparto), prescripción de reposo en cama, y/u observación y vigilancia del feto aumentadas), en caso necesario. En ciertas realizaciones, una paciente es seleccionada para la prueba del riesgo de la ROM espontánea si la paciente presenta uno o más de los siguientes signos: (i) un tiempo de gestación entre 20 semanas y 36 semanas y 6 días; y/o (ii) una longitud cervical de 25 mm o más; y/o (iii) una dilatación cervical de 3 cm o menos.

PAMG-1

45 La PAMG-1 [placenta alfa microglobulina 1] fue aislada en 1977 de fluido amniótico por D. Petrunin, y se denominó inicialmente alfa-1 globulina específica de placenta (D. Petrunin et al., "Immunological Identification of Organ Specific alpha-1 Globulin of Human Placenta and its Content in the Amniotic Fluid" (Identificación inmunológica de la alfa-1 globulina específica de órgano correspondiente a la placenta humana, y su contenido en el fluido amniótico), en Akusherstvo i Ginekologiya, 1977, N° 1, págs. 64-65, Moscú, URSS).

Las etapas proporcionadas a modo de ejemplo del aislamiento de la PAMG-1 del fluido amniótico de mujeres embarazadas se esbozan en la Tabla 1 y se exponen más adelante. Debe entenderse, sin embargo, que la PAMG-1 puede ser aislada de acuerdo con cualquier método adecuado conocido en la técnica, y de cualquier fuente adecuada.

50 **Tabla 1: Ejemplos de etapas de aislamiento de la PAMG-1**

Etapas de aislamiento	Pureza (%)	Producción (%)
Fluido amniótico entre 16 y 25 semanas de embarazo	4	100
Precipitación por medio de cloruro de lantano al 0,5%	25	90
Precipitación por sulfato de amonio al 50% de saturación	35	70

Etapas de aislamiento	Pureza (%)	Producción (%)
Precipitación por sulfato de litio al 60% de saturación	60	60
Separación cromatográfica de fase inversa	90	30

Se aisló PAMG-1 del fluido amniótico de mujeres con entre 16 y 25 semanas de gestación. El fluido se obtuvo de mujeres cuya gestación fue determinada como consecuencia de consideraciones médicas. Se añadió una solución al 10% de cloruro de lantano en una proporción volumétrica de 20:1 (de tal manera que su concentración final era del 0,5%) al fluido amniótico, y se mantuvo a 4°C durante 18 horas. El precipitado fue adicionalmente separado por centrifugación a 8.000 rpm durante 30 minutos. El precipitado fue disuelto en una solución saturada de Na₂HPO₄ y, a continuación, el precipitado de sales de lantano insolubles (producidas en el proceso de centrifugación a 8.000 rpm durante 30 minutos) fue separado. La solución resultante fue fraccionada con sulfato de amonio saturado al 50% mediante incubación a 4°C durante 18 horas, y el precipitado resultante fue disuelto en agua destilada de forma y manera tales, que se restituyó el volumen de las fracciones de precipitación disueltas al volumen inicial del fluido amniótico. A continuación, la solución fue precipitada por el 60% de sulfato de litio saturado, y el precipitado se disolvió en una pequeña cantidad de agua destilada. Tras la diálisis, las mixturas fueron adsorbidas con pirofosfato de calcio mediante la adición de un volumen igual de absorbente de humedad a la solución proteica, la mezcla mutua y la incubación durante 10-15 minutos, y la separación del absorbente por centrifugación.

El peso molecular de la PAMG-1 fue primeramente comunicado como 32 kDa (Boltovskaya, M. N. et al., "Histochemical and Clinico-Diagnostic Study of the Placental Alpha-Microglobuline [PAMG-1] Using Monoclonal Antibodies" (Estudio histoquímico y clínico-diagnóstico de la alfa-microglobulina de la placenta [PAMG-1] utilizando anticuerpos monoclonales), en el Boletín de Biología y Medicina Experimentales, 1991, N° 10, págs. 397-400); sin embargo, es generalmente aceptado en la actualidad que la PAMG-1 tiene un peso molecular de 34 kDa (véase, por ejemplo, Pollet-Villard et al. (Amer J Perinatol 2011 Jun; 28(6); 489-94)). La PAMG-1 es una proteína que está presente en el suero, en el fluido amniótico y en la secreción vaginal de las mujeres embarazadas. La PAMG-1 existe en el fluido amniótico en una concentración que es, aproximadamente, al menos 100 veces mayor que en el suero de las mujeres embarazadas y al menos 3.000 veces más grande que en las secreciones vaginales de las mujeres embarazadas, en ausencia de rotura de membranas fetales. Como resultado de ello, incluso cuando se disuelve una pequeña cantidad de líquido amniótico (aproximadamente 1/100 de una gota por 1 ml de secreción vaginal) en una muestra de secreción vaginal, existe una cantidad suficiente de PAMG-1 presente en esta muestra de secreción vaginal para indicar que ha tenido lugar la rotura de una membrana fetal. Por otra parte, debido a la baja concentración de PAMG-1 en el suero sanguíneo, una mixtura insignificante de suero sanguíneo con la muestra de fluido vaginal (entre el 10% y el 15%) no afecta a los resultados producidos por los dispositivos y métodos de la presente invención. La detección de PAMG-1 para el diagnóstico de la ROM se ha demostrado que es superior a la detección de otras proteínas amnióticas tales como, por ejemplo, la IGFBP-1, una proteína de 28 kDa (véase la divulgación de Pollet-Villard et al., (supra) y las European Guidelines on preterm labor (Directrices supranacionales y europeas sobre parto prematuro) (The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine (Diario sobre medicina materno-fetal y neonatal), 2011; Early Online, 1-9)).

Debido a que la presencia de fluido amniótico en una secreción vaginal puede ser indicativa de una rotura de la membrana fetal, la detección de la proteína amniótica PAMG-1 en la secreción vaginal puede ser utilizada para detectar la rotura de la membrana fetal. Sin embargo, se ha descubierto en el presente que los métodos divulgados en esta memoria pueden ser utilizados para detectar la PAMG-1 en secreciones vaginales incluso en ausencia de una ROM detectable, a fin de predecir de manera precisa el TTD, mediante el ajuste del umbral de detección de la PAMG-1 en aproximadamente 4 ng/ml. Si bien no es la intención adscribirse a ninguna teoría ni limitarse a ningún mecanismo de actuación particular, se cree que la PAMG-1 es trasudada a través de los poros corioamnióticos de las membranas fetales durante las contracciones del útero que se producen cuando el alumbramiento es inminente (esto es, cuando tendrá lugar, por ejemplo, en 14 días, en 7 días o en 48 horas). La degradación de la matriz extracelular de las membranas fetales debida al proceso inflamatorio del parto y/o a una infección puede también dar lugar al hallazgo de niveles aumentados de PAMG-1 en las secreciones cervicovaginales.

Anticuerpos de PAMG-1

Los métodos divulgados en la presente memoria abarcan la detección de la presencia de la proteína PAMG-1 en muestras de secreción vaginal obtenidas de mujeres embarazadas. La proteína PAMG-1 puede ser detectada de acuerdo con cualquier método adecuado conocido en la técnica.

Un método proporcionado a modo de ejemplo para la detección de PAMG-1 en muestras de fluido vaginal incluye el inmunoensayo (por ejemplo, ELISA) utilizando, por ejemplo, anticuerpos específicos de PAMG-1 (por ejemplo, anticuerpos monoclonales o fragmentos de enlace con antígeno de los mismos) descritos en esta memoria, si bien no está limitado por este.

Los anticuerpos de PAMG-1, tal y como se divulga en esta memoria, pueden ser detectados en concentraciones muy bajas de PAMG-1. Por ejemplo, es posible detectar concentraciones de 0,05 ng/ml de PAMG-1. Debido a que la concentración máxima de PAMG-1 en el suero es aproximadamente 25 ng/ml, en comparación con una concentración mínima de aproximadamente 1.680 ng/ml en el fluido amniótico, y debido a que la concentración de fondo de la PAMG-1 en las secreciones vaginales es muy baja, de aproximadamente 0,2 ng/ml, puede utilizarse una magnitud de umbral

más baja para la PAMG-1 en los métodos de la presente invención, a fin de detectar la aparición de fluido amniótico en la vagina. Se ha descubierto en el presente que puede utilizarse un umbral predefinido de aproximadamente 4 ng/ml de PAMG-1 en los métodos que se divulgan en la presente memoria.

5 Como resultado de ello, los dispositivos y métodos de la presente invención no se ven influenciados por la presencia de vaginitis u otras variables que tenían un impacto negativo en la precisión de los métodos anteriores para detectar roturas de membranas fetales. La concentración máxima de PAMG-1 en el exudado de inflamación es 3 ng/ml (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N° 7.709.272, por Fuks et al.). La misma concentración de PAMG-1 puede producirse si la mezcla de suero sanguíneo en secreción vaginal no supera el 10%-15%. Además de ello, una elevada proporción de concentraciones de suero con respecto a PAMG-1 amniótica hace que sea significativamente menos probable que los dispositivos y métodos de la presente invención produzcan falsos resultados positivos como consecuencia de la presencia de suero sanguíneo en secreciones vaginales, incluso con un bajo umbral de detección de PAMG-1.

10 La presente invención proporciona métodos y dispositivos para predecir el TTD para un umbral de detección de PAMG-1 de aproximadamente 4 ng/ml. El umbral de detección puede ser ajustado seleccionando anticuerpos de PAMG-1 (por ejemplo, un par de anticuerpos de enlace con PAMG-1) con afinidades de enlace específicas por la PAMG-1, de tal manera que la combinación de los anticuerpos de enlace con PAMG-1 proporciona el umbral de detección deseado. El umbral de detección puede también ser ajustado, por ejemplo, utilizando al menos uno o más anticuerpos adicionales en la región de ensayo (por ejemplo, la región de ensayo 14 de las Figuras 1 y 2) frente a la PAMG-1, a fin de ajustar el umbral de detección predefinido (véase la Patente de los EE.UU. N° 7.709.272, por Fuks et al.), o mediante el ajuste del procedimiento de ensayo, como se explica en detalle más adelante.

15 El polipéptido de PAMG-1 separado de los fluidos corporales, producido de forma recombinatoria o por síntesis química, y fragmentos u otros derivados o análogos de los mismos, incluyendo proteínas de fusión, pueden ser utilizados como inmunógeno para generar anticuerpos que reconozcan el polipéptido de PAMG-1. Los anticuerpos divulgados en esta memoria pueden incluir una cadena pesada de inmunoglobulina de cualquier isótopo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Los anticuerpos de PAMG-1 pueden tener una cadena tanto pesada como ligera.

20 Pueden utilizarse para llevar a cabo los métodos divulgados en esta memoria anticuerpos (incluyendo anticuerpos de longitud completa), anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos, y fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, fragmentos de enlace en epítipo de cualquiera de los anteriores, y formas de anticuerpos generadas por ingeniería, por ejemplo, moléculas scFv, siempre y cuando exhiban la actividad deseada, por ejemplo, enlace con PAMG-1. Los anticuerpos anti-PAMG-1 como, por ejemplo, los divulgados en esta memoria, pueden reconocer la PAMG-1 de una o más especies de mamífero diferentes. Alternativamente, un anticuerpo divulgado en la presente memoria puede ser específico de una única forma de PAMG-1. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-PAMG-1 es específico de la PAMG-1 humana.

25 Pueden formarse epítopos a partir tanto de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por doblamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados de aminoácidos continuos son, por lo común, retenidos de forma expuesta a disolventes desnaturalizantes, en tanto que los epítopos formados por doblamiento terciario se pierden, por lo común, en el tratamiento con disolventes desnaturalizantes. Un epítipo incluye, por lo común, al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Métodos para determinar la conformación espacial de epítopos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, la divulgación "Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology" (Protocolos de correlación de epítopos en métodos de biología molecular), Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

30 Los anticuerpos que reconocen un mismo epítipo o epítopos solapados pueden ser identificados en un simple inmunoensayo que muestra la capacidad de uno de los anticuerpos para bloquear el enlace de otro anticuerpo con un antígeno de objetivo, o diana, es decir, un ensayo de enlace competitivo. El enlace competitivo se determina en un ensayo en el que la molécula enlazante que se está ensayando inhibe el enlace específico de una molécula enlazante de referencia con un antígeno común, tal como la PAMG-1. Se conocen numerosos tipos de ensayos de enlace competitivo, por ejemplo: el radioinmunoensayo (RIA –"radioimmunoassay"–) directo o indirecto de fase sólida; el inmunoensayo enzimático (EIA –"enzyme immunoassay"–) directo o indirecto de fase sólida; el ensayo de competencia en emparejado (véase la divulgación de Stahl et al., *Methods in Enzymology* (Métodos de enzimología), 9: 242 (1983)); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (véase la divulgación de Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); ensayo de etiquetado directo en fase sólida, ensayo en emparejado de etiquetado directo en fase sólida (véase la divulgación de Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Anticuerpos: un manual de laboratorio), Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA de etiquetado directo en fase sólida utilizando la etiqueta 1-125 (véase la divulgación de Morel et al., *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (Cheung et al., *Virology* (Virología) 176: 546 (1990)); y RIA de etiquetado directo (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)).

Por lo común, semejante ensayo implica el uso de un antígeno purificado unido a una superficie sólida o a células que portan una de estas: una molécula de enlace de ensayo no etiquetado y una molécula de enlace de referencia etiquetado. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de etiqueta unida a la superficie sólida o a las células en presencia de la molécula enlazante de ensayo. Habitualmente, la molécula enlazante de ensayo está presente en exceso. Es habitual que, cuando una molécula enlazante en competencia está presente en exceso, inhiba el enlace específico de una molécula enlazante de referencia con un antígeno común en el menos el 50%-55%, el 55%-60%, el 60%-65%, el 65%-70%, el 70%-75% o más.

Pueden utilizarse diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales para polipéptido de PAMG-1 o derivados o análogos de los mismos. Para la producción de anticuerpos, diversos animales anfitriones pueden ser inmunizados mediante inyección del polipéptido de PAMG-1 o un derivado (por ejemplo, un fragmento o proteína de fusión) del mismo, incluyendo conejos, ratones, ratas, ovejas, cabras, etc., aunque no están limitados por estos. En una realización, el polipéptido de PAMG-1 o un fragmento del mismo puede ser conjugado con un portador inmunogénico, por ejemplo, albúmina de suero bovino (BSA –“bovine serum albumin”–) o hematoxianina de lapa californiana (KLH –“keyhole limpet hematoxianin”–). Pueden utilizarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie anfitriona, incluyendo el de Freund (completo o incompleto), geles minerales tales como el hidróxido de aluminio, sustancias superficialmente activas tales como la lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol, así como adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como la BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y el *Corynebacterium parvum*, si bien no están limitados por estos.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos al polipéptido PAMG-1, o un fragmento, o análogo, o un derivado del mismo, puede utilizarse cualquier técnica que haga posible la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen la técnica del hibridoma, originalmente desarrollada por Kohler y Milstein (*Nature* 1975, 256:495-497), así como la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor et al., *Immunology Today* 1983, 4:72; Cote et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1983, 80:2026-2030), y la técnica del hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* (Anticuerpos monoclonales y terapia del cáncer), Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96, 1985), si bien no están limitadas por estas. En una realización adicional de la presente invención, pueden producirse anticuerpos monoclonales en animales carentes de gérmenes (Publicación de Patente Internacional N° WO 89/12690, publicada el 28 de diciembre de 1989). De hecho, de acuerdo con la presente invención, pueden utilizarse técnicas desarrolladas para la producción de ‘anticuerpos quiméricos’ (Morrison et al., *J. Bacteriol.* 1984, 159:870; Neuberger et al., *Nature* 1984, 312:604-608; Takeda et al., 1985, *Nature* 314: 452-454) mediante el empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón específica para un polipéptido de PAMG-1 con genes de una molécula de anticuerpo humano de una actividad biológica apropiada; tales anticuerpos se encuentran dentro del alcance de esta presente invención. Tales anticuerpos quiméricos humanos o humanizados se prefieren para uso en la terapia de enfermedades o afecciones humanas (que se describen más adelante), ya que es mucho menos probable que los anticuerpos humanos o humanizados induzcan una respuesta inmune en comparación con los anticuerpos xenogénicos, en particular, una respuesta alérgica, por sí mismos.

De acuerdo con la presente invención, técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena única (Patentes de los EE.UU. Nos. 5.476.786 y 5.132.405, asignadas a Huston; Patente de los EE.UU. N° 4.946.778) pueden ser adaptadas para producir anticuerpos de cadena única específicos del polipéptido de PAMG-1. Ciertamente, estos genes pueden ser suministrados para expresión in vivo. Una realización adicional de la invención se sirve de las técnicas descritas para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (Huse et al., *Science* 1989, 246: 1275-1281), a fin de permitir una rápida y fácil identificación de fragmentos de Fab monoclonales con la especificidad deseada para un polipéptido de PAMG-1, o sus derivados o análogos.

Pueden generarse fragmentos de anticuerpo que contienen el idiotipo de la molécula de anticuerpo por técnicas conocidas. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen el fragmento F(ab)₂, que puede ser producido por la digestión de pepsina de la molécula de anticuerpo; los fragmentos de Fab que pueden ser generados mediante la reducción de los puentes de disulfuro del fragmento F(ab)₂, y los fragmentos de Fab que pueden ser generados por tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor, si bien no están limitados por estos.

En la producción de anticuerpos, el apantallamiento del anticuerpo deseado puede ser llevado a cabo por técnicas conocidas en la tecnología, por ejemplo, el radioinmunoensayo, el ELISA (ensayo inmunosorbente enlazado con enzima –“enzyme-linked immunosorbent assay”–), inmunoensayos en ‘emparedado’, ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitación de difusión por gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos in situ (utilizando oro coloidal, enzima o etiquetas de radioisótopos, por ejemplo), manchas Western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo, ensayos de aglutinación por gel, ensayos de hemoaglutinación), ensayos de fijación de complementos, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A y ensayos de inmunoelectroforesis, por ejemplo. En una realización, el enlace de anticuerpos es detectado mediante la detección de una etiqueta en el anticuerpo primario. En otra realización, el anticuerpo primario es detectado mediante la detección del enlace de un anticuerpo secundario o reactivo con el anticuerpo primario. En una realización adicional, el anticuerpo secundario es etiquetado. Se conocen en la técnica numerosos medios para detectar el enlace en un inmunoensayo que se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, a fin de seleccionar anticuerpos que reconozcan un epítipo específico de un polipéptido de PAMG-1, pueden ensayarse hibridomas generados para un producto que

se enlaza con un fragmento de polipéptido de PAMG-1 que contiene tal epítipo. En cuanto a la selección de un anticuerpo específico para un polipéptido de PAMG-1 a partir de una especie particular de animal, es posible seleccionarlo basándose en un enlace positivo con polipéptido de PAMG-1 expresado por, o aislado de, células de esa especie de animal.

5 En ciertos aspectos que se divulgan en esta memoria, los anticuerpos monoclonales específicos de PAMG-1 divulgados en la presente memoria pueden ser, por ejemplo, M271, producido por el hibridoma N271, depositado con el Depositario de la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM) y con número de ingreso asignado VKPM-93; M52, producido por el hibridoma N52, depositado con la VKPM y con número de ingreso asignado VKPM-92; y M42, producido por el hibridoma N42, depositado con la VKPM y con número de ingreso asignado VKPM-94. Las propiedades enlazantes y otras características de esos anticuerpos monoclonales específicos de PAMG-1 se divulgan en detalle en la Patente de los EE.UU. N° 7.709.272, asignada a Fuks et al. Líneas celulares de hibridoma que producen, por ejemplo, anticuerpos específicos de PAMG-1, tales como las divulgadas anteriormente, pueden ser producidas por el siguiente procedimiento. En primer lugar, se inmunizan con PAMG-1 ratones que tienen células B del bazo y de los nodos linfáticos. Se producen entonces hibridomas para inmortalizar las células B. Las células B pueden ser células B del bazo y/o de los nodos linfáticos. Estos hibridomas, que producen un anticuerpo monoclonal que tiene una afinidad de enlace para la PAMG-1, son entonces identificados en un ELISA: primera capa: PAMG-1; segunda capa: sobrenadante de hibridoma; y tercera capa: conjugado de anticuerpos antirratón de conejo etiquetados con peroxidasa de rábano picante. Estos hibridomas identificados son entonces cultivados in vitro o en líquido ascítico, y los anticuerpos monoclonales que producen son aislados.

20 Como se ha divulgado en esta memoria, dos o más anticuerpos específicos de PAMG-1 (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) pueden ser utilizados en combinación para detectar la PAMG-1 en una muestra de fluido vaginal. En ciertas realizaciones, al menos uno de los anticuerpos utilizados en un método que se divulga en esta memoria es etiquetado de forma detectable. Pueden utilizarse una variedad de marcadores detectables, incluyendo partículas manchadas, enzimas, pigmentos fluorescentes e isótopos radiactivos, si bien no están limitados por estos. Un ejemplo particular de marcador detectable es una partícula manchada con oro que tiene una dimensión promedio comprendida en el intervalo entre 20 nm y 30 nm. Otro ejemplo de marcador detectable es la peroxidasa de rábano picante. Se describen métodos para fijar un marcador detectable a un anticuerpo, por ejemplo, en *Methods in Enzymology* (Métodos de enzimología), 1981, Vol. 73, págs. 3-46, por Harlow, E. y Lane, D.; en la divulgación "Antibodies: A Laboratory Manual" (Anticuerpos: un manual de laboratorio), Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, págs. 322, 323 y 343; y Pierce Catalog (Catálogo Pierce) págs. T9-T17 (1996). Enzimas adecuadas incluyen la fosfatasa alcalina y la peroxidasa de rábano picante, si bien no están limitadas por estas. Otros marcadores o etiquetas para uso de acuerdo con la presente invención incluyen oro coloidal, bolitas de látex coloreadas, bolitas magnéticas, etiquetas fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato fluorescente (FITC –"fluorescent isothiocyanate"–), ficoeritrina (PE –"phycoerythrin"–), rojo de Texas (TR –"Texas red"–), rodamina, sales de la serie lantánida, libres queladas, especialmente Eu³⁺, por nombrar algunos fluoróforos), moléculas quimioluminiscentes, radioisótopos (¹²⁵I, ³²P, ³⁵S, Tc quelado, etc.), o etiquetas de formación de imagen por resonancia magnética, si bien no están limitados por estos. Otros marcadores incluyen marcadores de temple de fluorescencia y de transferencia de fluorescencia, por ejemplo, como se utilizan en ensayos homogéneos así como en ensayos de fase sólida. Por otra parte, de acuerdo con la presente invención, un marcador puede ser un epítipo, un socio enlazante o una "manija" para la interacción con otra molécula, tal como biotina-estreptavidina, glutatióna-GST, hexahistidina-níquel, etc. La presente invención también contempla el uso de anticuerpos secundarios, los cuales son, en cuanto a ellos, etiquetados de forma detectable, como marcadores (por ejemplo, en una situación en la que el par de anticuerpo anti-PAMG-1 utiliza anticuerpos con porciones Fc de dos especies animales diferentes).

45 Los anticuerpos divulgados en la presente memoria pueden ser movilizables (por ejemplo, capaces de trasladarse con la presentación de una muestra de fluido (por ejemplo, dentro de un dispositivo de flujo)) y/o inmovilizados (por ejemplo, en la región de ensayo de un dispositivo de tiras). Son bien conocidos en la técnica métodos para inmovilizar anticuerpos.

Detección de PAMG-1

50 Los inmunoensayos, particularmente los ensayos de inmunocromatografía, constituyen una técnica preferida de acuerdo con la presente invención, y se exponen inmunoensayos en detalle más adelante. Estos ensayos tienen las ventajas de la especificidad, precisión, velocidad y economía. Pueden también utilizarse, sin embargo, otros métodos para detectar y cuantificar la PAMG-1. Una de estas técnicas es la espectrometría de masas, por ejemplo, utilizando la espectrometría de masas (MS –"mass spectrometry"–) de tiempo de vuelo (TOF –"time-of-flight"–) de desorción por láser asistida por matriz (MALDI –"matrix-assisted laser-desorption"–), con extracción retardada y un reflectrón en la cámara de tiempo de vuelo. Preferiblemente, los ensayos de MALDI se llevan a cabo sobre conjuntos geoméricamente ordenados de silicio. Un ejemplo de conjunto geoméricamente ordenado para MALDI consiste en almohadillas de gel circulares de 200 µm en centros de 350 µm, sobre silicio oxidado. Una superficie hidrofóbica (superficie repelente) entre las almohadillas de gel proporciona, adicionalmente, un punto de matriz / proteína más enfocado para MALDI, por lo que se mejora la señal para su cuantificación. Por ejemplo, los puntos que se producen utilizando el sistema Packard Bioscience pueden ser menores de 200 µm de diámetro. El sistema Piezo puede aportar aproximadamente 300 pl de matriz de MALDI (por ejemplo, DHB, ácido sinapínico) a la posición exacta del punto de agente de captación de afinidad-péptido para crear un cristal de péptido / matriz homogéneo. La desorción / ionización

(Karas et al., Ion Processes (Procesos iónicos), 1987, v. 78, págs. 53-68, o Zenobi et al., Mass Spectrom. Rev. 1998, v.17, págs. 337-366) a partir de este cristal en un MALDI-MS (por ejemplo, de Perspective Voyager) arroja un espectro de masas en el que la altura de un pico de péptido es relativa con respecto a la cantidad de proteína que contiene ese péptido.

- 5 Una técnica alternativa para uso en los métodos divulgados en esta memoria es la cromatografía de electroforesis por capilaridad, que puede permitir la cuantificación de un analito presente en una pequeña cantidad de muestra.

Por otra parte, pueden emplearse técnicas bioquímicas cuantitativas tales como la electroforesis de gel de poliacrilamida, la cromatografía líquida de alto rendimiento y otras similares, por sí solas o en combinación, para detectar y cuantificar la cantidad de PAMG-1 presente en una muestra.

- 10 Tales inmunoensayos que utilizan anticuerpos específicos de PAMG-1 proporcionados a modo de ejemplo y abarcados por los métodos presentemente divulgados, se describen en detalle en la Patente los EE.UU. N° 7.709.272, por Fuks et al.

Métodos y dispositivos inmunológicos para la detección de PAMG-1

- 15 Pueden utilizarse diversos métodos conocidos en la técnica para la detección del enlace inmunespecífico de un anticuerpo a un antígeno, para la detección del enlace de acuerdo con la presente invención. Uno de los primeros métodos para la detección de la interacción entre un antígeno y un anticuerpo implicados en el análisis del complejo es por precipitación en geles. Un método adicional para detectar un par de enlace de analito-anticuerpo detector incluye el uso de anticuerpos detectores radioyodados o de una proteína radioyodada que es reactiva con IgG, tal como la Proteína A. Estos métodos tempranos son bien conocidos por las personas expertas en la técnica, tal y como se revisan en Methods in Enzymology (Métodos de enzimología), 1980, v. 70, págs. 166-198. Seleccionando un anticuerpo y condiciones que dan lugar a un resultado positivo por encima de los valores de umbral para PROM divulgados en esta memoria, es posible emplear esta tecnología en la práctica de los métodos divulgados en esta memoria.

- 25 Métodos ulteriores para determinar la presencia de un analito en una muestra utilizando un único anticuerpo incluían los ensayos de enlace competitivo. En esta técnica, el anticuerpo, que, la mayoría de las veces, estará inmovilizado sobre un soporte sólido, se expondrá a una muestra de la que se sospecha que contiene el analito conjuntamente con una cantidad conocida de analito etiquetado. Los dos analitos, el analito etiquetado y el analito contenido en la muestra, competirán entonces para enlazarse en lugares del anticuerpo. Se determina uno de entre el analito etiquetado libre y el analito etiquetado enlazado, y, a partir de esta medición, puede conocerse la cantidad de analito en competencia contenido en la muestra. Una descripción más completa de este método se divulga en la publicación "Basic Principles of Antigen-Antibody Reaction" (Principios básicos de la reacción antígeno-anticuerpo), Elvin A. Labat (Methods in Enzymology, 70, 3-70, 1980). En este ejemplo, el analito etiquetado puede ser etiquetado bien con un radioisótopo, bien con una etiqueta de enzima.

- 35 Inmunoensayos más actuales utilizan un método de anticuerpo doble para detectar la presencia de un analito. Estas técnicas se revisan también en el volumen antes referido de Methods in Enzymology. Por lo tanto, de acuerdo con una realización de la presente invención, la presencia de los marcadores individuales se determina utilizando un par de anticuerpos para cada uno de los marcadores que se han de detectar. Se hace referencia en esta memoria a uno de dicho par de anticuerpos como 'anticuerpo detector', y el otro de dicho par de anticuerpos se refiere en la presente memoria como 'anticuerpo de captación'. Una realización de la presente invención utiliza, por tanto, el método de emparedado de anticuerpo doble para detectar la PAMG-1 en una muestra de fluido vaginal. En este método, el analito es emparedado entre el anticuerpo detector y el anticuerpo de captación, estando el anticuerpo de captación irreversiblemente inmovilizado sobre un soporte sólido. El anticuerpo detector contendrá una etiqueta detectable, a fin de identificar la presencia del emparedado de anticuerpo-analito y, por tanto, la presencia del analito.

- 45 Las primeras formas comunes de soportes sólidos incluyen placas, tubos o bolitas de poliestireno, todos los cuales son bien conocidos en el campo del radioinmunoensayo y del inmunoensayo enzimático. Más recientemente, diversos materiales porosos, tales como el nilón, la nitrocelulosa, el acetato de celulosa, las fibras de vidrio y otros polímeros porosos, se han venido empleando como soportes sólidos.

- 50 Así, pues, en una realización específica, el dispositivo de la invención comprende medios para llevar a efecto un ensayo inmunocromatográfico ('dispositivo de ensayo inmunocromatográfico' -"immunochromatographic assay device"-). Semejante dispositivo comprende unos medios de fase sólida para conducir un líquido. Tal y como se utiliza en esta memoria, la expresión 'medios de fase sólida para conducir un líquido' se refiere a un soporte sólido que permite la migración de un líquido a su través, por ejemplo, mediante efecto capilar. Un producto típico de esta naturaleza es una membrana de nitrocelulosa, que puede ser preparada por métodos bien conocidos por los expertos de la técnica.

- 55 Se conocen en la técnica numerosos medios y formatos de ensayo inmunocromatográfico que pueden ser utilizados en la práctica de los métodos que se divulgan en esta memoria. Los ensayos inmunocromatográficos que se sirven de una membrana como soporte sólido en una varilla de inmersión o dispositivo de flujo pasante, están bien establecidos para uso en el laboratorio clínico y en ensayos en lugares alternativos, esto es, fuera de laboratorio. La

presentación habitual para un dispositivo de ensayo inmunocromatográfico es una membrana (celulósica o no celulósica) encerrada en un soporte de plástico. El soporte de plástico mantiene la membrana en una configuración adecuada al objeto de garantizar el correcto funcionamiento de todo el dispositivo. Existen numerosas variantes de la estructura básica de los dispositivos de ensayo. Por ejemplo, Litman et al. (Patentes de los EE.UU. Nos. 5.156.952 y 5.030.558) describen un método y un dispositivo de ensayo para determinar la presencia de una cantidad mínima de un analito en una muestra. Ullman et al. (Patentes de los EE.UU. Nos. 5.137.808 y 4.857.453) describen un dispositivo destinado a albergar una membrana de ensayo que incluye reactivos líquidos autocontenidos para ayudar al flujo de la muestra. Dafforn et al. (Patente de los EE.UU. N° 4.981.768) describe un dispositivo provisto de lumbreras para la aplicación de muestra y de líquido añadido. Corti et al. (Solicitud de Patente Europea N° 89118378.2), Greenquist et al. (Patente de los EE.UU. N° 4.806.312) y Berger et al. (Patente de los EE.UU. N° 5.114.673) también describen dispositivos de ensayo.

Preferiblemente, los medios de ensayo inmunocromatográfico incluyen un control destinado a indicar que el ensayo se ha desarrollado correctamente. El control puede consistir en un reactivo enlazante específico en un punto situado en posición más distal, o alejada, del punto de aplicación de la muestra, en el soporte de fase sólida, que la zona de detección que se enlazará al reactivo etiquetado en presencia o en ausencia de analito, indicando de esta forma que el receptor movilizable ha migrado una distancia suficiente con la muestra líquida como para proporcionar un resultado significativo.

Etiquetas adecuadas para uso en ensayos inmunocromatográficos incluyen las enzimas, los fluoróforos, los cromatóforos, los radioisótopos, los pigmentos, el oro coloidal, el carbón coloidal, partículas de látex y agentes quimioluminiscentes. Cuando se emplea un marcador de control, es posible utilizar las mismas o diferentes etiquetas para el receptor para el marcador de control.

Una realización de la presente invención se sirve de un dispositivo de inmunoensayo del tipo de flujo pasante. Valkirs et al. (Patente de los EE.UU. N° 4.632.901) divulga un dispositivo que comprende un anticuerpo específico de un analito de antígeno, enlazado con una membrana porosa o filtro al que se ha añadido una muestra líquida. A medida que el líquido fluye a través de la membrana, analitos de objetivo o diana se enlazan con el anticuerpo. La adición de la muestra es seguida por la adición de un anticuerpo etiquetado. La detección visual del anticuerpo etiquetado proporciona una indicación de la presencia del analito diana en la muestra.

Otro ejemplo de dispositivo de flujo pasante es el divulgado por Kroner et al. (documento EP-A- 0 229 359), el cual describe un sistema de aporte de reactivo que comprende una matriz saturada con un reactivo o componentes del mismo dispersados en un polímero soluble en agua, con el fin de controlar la velocidad de disolución del reactivo con vistas a su aporte a una matriz de reacción situada bajo la matriz.

En ensayos del tipo de migración, el soporte de fase sólida, por ejemplo, la membrana, se impregna con los reactivos necesarios para llevar a cabo el ensayo. Se proporciona una zona de detección de analito en la que se enlaza el analito etiquetado, y se leen los resultados del ensayo. Véanse, por ejemplo, las divulgaciones de Tom et al. (Patente de los EE.UU. N° 4.366.241) y Zuk (EP-A- 0 143 574). Los dispositivos de ensayo de migración incorporan habitualmente dentro de ellos reactivos que han sido fijados a etiquetas coloreadas tales como oro coloidal o carbono, con lo que permiten una detección visible de los resultados del ensayo sin necesidad de añadir sustancias adicionales. Véanse, por ejemplo, las divulgaciones de Bernstein et al. (Patente de los EE.UU. N° 4.770.853), May et al. (documento WO 88/08534), y Ching et al. (documento EP-A- 0 299 428). Todos estos tipos conocidos de dispositivos de flujo pasante pueden ser utilizados de acuerdo con los métodos que se divulgan en esta memoria.

Las etiquetas directas son uno de los ejemplos de etiquetas que pueden utilizarse en ensayos inmunocromatográficos de conformidad con la presente invención. Una etiqueta directa ha sido definida como una entidad que, en su estado natural, es fácilmente visible, ya sea a simple vista, ya sea con la ayuda de un filtro óptico y/o una estimulación aplicada, por ejemplo, luz UV, para favorecer la fluorescencia. Ejemplos de etiquetas coloreadas que pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención incluyen partículas de sol metálico, por ejemplo, partículas de sol de oro, tales como las que se describen por Leuvering (Patente de los EE.UU. N° 4.313.734); partículas de sol de pigmento, tales como las que se describen por Gribnau et al. (Patente de los EE.UU. N° 4.373.932) y por May et al. (documento WO 88/08534); látex pigmentado, tal como se describe por May, más arriba, Snyder (documentos EP-A- 0 280 559 y EP-A- 0 281 327); o bien pigmentos encapsulados dentro de liposomas según se describe por Campbell et al. (Patente de los EE.UU. N° 4.703.017). Otras etiquetas directas incluyen un radionucleido, una fracción fluorescente o una fracción luminiscente. Además de estos dispositivos de etiquetado directo, pueden también ser utilizadas etiquetas indirectas que comprenden enzimas de acuerdo con la presente invención. Son bien conocidos en la técnica diversos tipos de inmunoensayos asociados a enzimas, por ejemplo, fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano picante, lisozima, deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato, deshidrogenasa de lactato, ureasa; estos y otros han sido expuestos en detalle por Eva Engvall en la divulgación "Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT" (Inmunoensayo enzimático ELISA y EMIT), de Methods in Enzymology, 70, 419-439, 1980, y en la Patente de los EE.UU. N° 4.857.453.

En una realización específica, el dispositivo de diagnóstico de la presente invención comprende un conjunto de membrana que tiene una sección de detección en posición proximal, o más cercana, con respecto al punto de presentación de la muestra, y una sección de captación situada aguas abajo de esa posición. La sección detectora contiene anticuerpos (anticuerpos detectores) (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) que reaccionarán con

5 cualesquiera analitos de la presente invención que estén presentes en la muestra. Los anticuerpos detectores están inmovilizados de forma reversible sobre la membrana y migrarán con la muestra en el momento en que se utilice. Se prefiere, aunque no es esencial, que los anticuerpos detectores estén etiquetados, por ejemplo, con un radionucleido, una enzima, una fracción fluorescente, una fracción luminiscente o una etiqueta coloreada tal como los descritos en la técnica anterior y previamente explicados. Concretamente, podría emplearse una etiqueta radiactiva, de tal manera que, por ejemplo, el anticuerpo tendrá un aspecto dorado antes de la captación del antígeno, y cambiará a púrpura con la captación.

10 La sección de captación, que, como se ha afirmado, se encuentra aguas abajo con respecto a la sección detectora, comprende anticuerpos de captación (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) que están irreversiblemente inmovilizados sobre el soporte sólido de manera tal, que cada anticuerpo está inmovilizado en una posición diferente de la sección de captación. Los anticuerpos y los reactivos necesarios son inmovilizados sobre el soporte sólido utilizando técnicas estándar y reconocidas, tal y como se expone para los dispositivos de inmunoensayo del tipo de flujo pasante explicados previamente. En general, los anticuerpos son absorbidos sobre los soportes sólidos como resultado de interacciones hidrofóbicas entre subestructuras proteínicas no polares y material de matriz de soporte no polar.

15 Una ventaja particular de la tecnología de ensayo inmunocromatográfica de la presente invención es que supera la incapacidad de estos ensayos para proporcionar datos cuantitativos. Así, la sección de captación puede contener una mezcla de anticuerpos inmovilizados específicos para la PAMG-1, de tal manera que únicamente se produce una señal cuando la cantidad de PAMG-1 de la muestra supera el umbral de detección deseado.

20 Además de ello, la presente invención contempla el uso de formatos de inmunoensayo homogéneos. Un ejemplo de un tal método homogéneo competitivo se encuentra en la Patente de los EE.UU. N° 3.817.837, por Bernstein y Ullman, que describe una técnica en la que un ligando y un ligando enlazado con enzima compiten por lugares de enlace con anticuerpos. Semejante enlace del anticuerpo con el ligando enlazado con enzima altera su actividad enzimática, de manera que la concentración del ligando presente puede ser estimada midiendo la velocidad a la que tal mezcla convierte el sustrato en producto. De esta forma, en un método homogéneo, la propiedad de susceptibilidad de detección de la etiqueta es inherentemente diferente dependiendo de si está enlazada o no enlazada. En su estado enlazado, la etiqueta tendrá una mayor o menor intensidad de señal. Habitualmente, en enlace de un anticuerpo al ligando etiquetado provoca una disminución de la intensidad de la señal, por ejemplo, cuando la etiqueta es una enzima. Productos convencionales de esta categoría incluyen la línea EMIT de inmunoensayos enzimáticos de la Syva Company, así como la línea TDX de inmunoensayos de polarización por fluorescencia de la Abbott Diagnostics. Puede prepararse un ensayo homogéneo concreto con la disposición de todos los analitos sobre bolitas, en cuyo caso la muestra será introducida y las bolitas serán, tras ello, atemperadas y detectadas.

30 Otros ejemplos de dispositivos de diagnóstico biológico que pueden ser utilizados de acuerdo con la presente invención incluyen los dispositivos descritos por G. Grenner, P.B. Diagnostics Systems, Inc., en las Patentes de los EE.UU. Nos. 4.906.439 y 4.918.025. El dispositivo de la Patente de Grenner N° 4.906.439 comprende un elemento de ensayo para diagnóstico, así como una unidad de aplicación de muestra que comprende un elemento de aporte de fluido que se caracteriza por tener una capa con una pluralidad de acanaladuras para el aporte de la muestra al elemento de ensayo. La Patente de Grenner N° 4.918.025 se refiere a un dispositivo que incluye unos medios de presentación de muestra tales como una membrana, adyacentemente a la cual se coloca un capilar que contiene un reactivo fijado y un depósito de líquido residual. La liberación del reactivo fijado del capilar completa la reacción una vez que se ha depositado la muestra, y el exceso de líquido es retenido por el depósito de residuos, de tal manera que el dispositivo es autónomo.

35 Si bien se prefiere la medición con una membrana, ha de comprenderse que pueden, de la misma, manera, utilizarse otras técnicas y dispositivos sensores correspondientes de un modo similar a lo anterior. Se dispone en la actualidad de diversos tipos de aparatos de ensayo automatizados capaces de asumir un ensayo para un cierto número de muestras al mismo tiempo. Estos aparatos de ensayo automatizados incluyen los aparatos de ensayo de acceso continuo / aleatorio. Ejemplos de tales sistemas incluyen el OPUS™, de la P.B. Diagnostics Systems, Inc., y el Analizador IMX™, presentado por la Abbott Laboratories, de North Chicago, Ill (Illinois), en 1988. En general, una muestra del fluido de ensayo se proporciona, por lo común, dentro de un repiente para muestras, y todas las etapas del procedimiento, incluyendo el pipeteado de la muestra al interior del elemento de pruebas del ensayo, la incubación y la lectura de la señal obtenida, se llevan a cabo automáticamente. Los sistemas de ensayo automatizados incluyen generalmente una serie de estaciones de trabajo, cada una de las cuales lleva a cabo una de las etapas del procedimiento de ensayo. El elemento de ensayo puede ser transportado de una estación de trabajo a la siguiente por diversos medios, tales como un carrusel o un estante móvil, a fin de permitir que las etapas del ensayo se lleven a cabo de forma secuencial. Los elementos de ensayo también incluyen una abertura para permitir la administración de una cantidad predeterminada de fluido de muestra y, si es necesario, de cualquier otro reactivo requerido a un miembro poroso. El elemento de muestra puede también incluir una ventana para permitir que una señal obtenida como resultado de las etapas del procedimiento, por lo común, un cambio fluorescente o colorimétrico en los reactivos presentes en el miembro poroso, sea leída, tal como por medio de espectroscopia o de un fluorímetro, los cuales están incluidos en el sistema de ensayo. Los instrumentos de ensayo automatizados de la PB Diagnostic Systems, Inc. se describen en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.051.237, 5.138.868, 5.141.871 y 5.147.609.

Clases adicionales de sistemas analizadores inmunoquímicos que pueden utilizarse a la hora de llevar a la práctica los métodos divulgados en la presente memoria son los biosensores o los sistemas inmunosensores ópticos. En general, un biosensor óptico es un dispositivo que se sirve cuantitativamente de principios ópticos para convertir concentraciones o actividades químicas o bioquímicas de interés en señales eléctricas. Estos sistemas pueden ser agrupados en cuatro categorías principales: técnicas de reflexión; resonancia de plasmón superficial; técnicas de fibra óptica y dispositivos ópticos integrados. Las técnicas de reflexión incluyen la elipsometría, la espectroscopia de reflexión integral múltiple, y los dispositivos de llenado de capilar fluorescente. Las técnicas de fibra óptica incluyen la fluorescencia de campo evanescente, el tubo capilar de fibra óptica, y los sensores de fluorescencia de fibra óptica. Los dispositivos ópticos integrados incluyen la fluorescencia de campo evanescente aplanador, el inmunosensor acoplador de gradación de entrada, el interferómetro de Mach-Zehnder, el interferómetro de Hartmann y los sensores de interferometría por diferencia. La detección holográfica de reacciones de enlace se lleva a cabo detectando la presencia de una imagen holográfica que se genera en una posición de imagen predeterminada cuando uno de los reactivos de un par enlazante se enlaza con un segundo reactivo inmovilizado del par enlazante (véase la Patente de los EE.UU. Nº 5.352.582, expedida el 4 de octubre de 1994 a Lichtenwalter et al.). Ejemplos de inmunosensores ópticos se describen, en general, en un artículo de revista por A. Robins (Advances in Biosensors (Avances en biosensores)), Vol. 1, págs. 229-256, 1991. Descripciones más específicas de estos dispositivos se encuentran, por ejemplo, en las Patentes de los EE.UU. Nos. 4.810.658, 4.978.503 y 5.186.897; en la divulgación de R.A. Bradley et al. (Phil. Trans. R. Soc. Land. B 316, 143-160, 1987); y en la divulgación de G. A. Robertson et al. (en Sensors and Actuators (Sensores y dispositivos de accionamiento), Elsevier, 1992).

Los métodos y los conjuntos correspondientes de la presente invención son capaces de incorporación y puesta en práctica dentro de una variedad de sistemas de medición ópticos. Concretamente, si bien los conjuntos y materiales de la presente invención pueden ser llevados a la práctica en un formato de inmunoensayo, tal formato es, en sí mismo, susceptible de materializarse en una variedad de sistemas de detección optoelectrónica. Más concretamente, se conocen ya una variedad de tecnologías de inmunosensores ópticos que pueden ser facilitadas e implementadas en la práctica de los métodos que se divulgan en esta memoria. Así, pues, por ejemplo, dispositivos y técnicas tales como las técnicas de reflexión, la resonancia de plasmón superficial, las técnicas de guía de ondas de fibra óptica y los dispositivos ópticos integrados, pueden ser, todos ellos, adoptados y configurados específicamente para detectar y presentar visualmente los resultados del examen de una muestra biológica de una paciente, de acuerdo con el presente método. Técnicas de reflexión particulares tales como la reflectometría y la elipsometría, así como el uso específico de fibras ópticas, guías de onda ópticas, dispositivos de llenado de capilar fluorescente y biosensores ópticos integrados, representan únicamente unas pocas de las variantes de técnicas y equipamiento que pueden emplearse. Un repaso general de estos dispositivos puede encontrarse en la divulgación de Robinson, G. A.: Optical Immunosensors: An Overview, Advances in Biosensors (Inmunosensores ópticos: una visión general, avances en biosensores), Vol. 1 págs. 229-256 (1991).

Más concretamente, la elipsometría se basa en la dirección de un haz de luz polarizado, primeramente contra una superficie de referencia (un estándar) y, tras ello, contra una superficie de muestra, a continuación de lo cual puede hacerse una comparación de la naturaleza y magnitud de las reflexiones resultantes. En particular, se medirá el enlace del analito a las moléculas receptoras como una cadena, midiendo el espesor de la superficie con respecto a la superficie de referencia.

En el caso de espectroscopia de reflexión interna múltiple, por ejemplo, el ligando y el receptor pueden ser inmovilizados de forma covalente sobre la superficie óptica de una guía de ondas de cuarzo fundido plana, tras lo cual el haz de luz puede ser reflejado internamente dentro de la guía de ondas para que penetre en el seno de una solución adyacente a la guía de ondas, de tal modo que las diferencias refractivas serán susceptibles de medición entre el estándar y la muestra. En este formato particular, puede haber una etiqueta fluorescente asociada y pueden tomarse mediciones de la fluorescencia de resultados de ello, a fin de determinar la magnitud presente del enlace.

Una técnica adicional se sirve de la tecnología conocida como dispositivo de llenado de capilar fluorescente. En esta tecnología particular, se utilizan dos placas de vidrio mantenidas separadas por un intersticio de dimensión capilar. Pueden inmovilizarse moléculas receptoras sobre la placa de base, que también actúa como guías de ondas óptica. Pueden llevarse a cabo ensayos competitivos o en emparejado que se sirven de etiquetado de FITC, de manera que se acopla una fluorescencia inducida dentro de la guía de ondas con la señal procedente de fuentes enlazadas, en contraposición con las fuentes no enlazadas. Tal señal es discriminada por su divergencia angular al salir de la guía de ondas. También se han preparado dispositivos de resonancia de plasmón superficial (SPR –“Surface Plasmon Resonance”–) que funcionan en respuesta al acoplamiento de la luz incidente sobre una película de metal delgada, en modos superficiales asociados con oscilaciones electrónicas colectivas en el seno de la película metálica. El estado de resonancia depende de las características ópticas de la película metálica, de su espesor, de los índices de refracción del dieléctrico situado en una de las caras de la misma, y del ángulo de incidencia de la luz. Las moléculas receptoras se enlazan a la cara superior de la película de metal, y la luz es dirigida hacia la cara inferior de la película, tal como a través de un sustrato de prisma. El analito diana, cuando se enlaza con estos receptores, causará un desplazamiento del estado de resonancia debido al cambio que produce en el índice de refracción local. La resonancia se observa mediante un seguimiento de la intensidad de luz reflejada a medida que varía el ángulo de incidencia del haz de luz sobre la película metálica. El cambio del ángulo de resonancia está directamente correlacionado con la cantidad de analito enlazada.

Las técnicas que implican sistemas de fibra óptica incluyen la fluorescencia de campo evanescente. En este caso, se retira el revestimiento del extremo de una fibra óptica, con lo que se produce un elemento sensor que interacciona de forma evanescente con el medio circundante. Las moléculas receptoras se enlazan con la superficie de fibra expuesta, de manera que pueden llevarse a cabo ensayos directos utilizando la fluorescencia natural del receptor y proteínas conjugadas. Pueden llevarse a cabo ensayos competitivos o en emparejado utilizando etiquetado de FITC para conseguir una mayor sensibilidad. En funcionamiento, una onda luminosa es acoplada en el seno de la fibra, y una parte de la fluorescencia producida de forma evanescente es acoplada de vuelta al seno de la fibra y propagada de vuelta al detector.

Una técnica adicional que utiliza tecnología de fibra óptica implica el tubo capilar de fibra óptica, en el que una fibra óptica desnuda es encerrada dentro de una cámara de llenado cilíndrica, lo que dar lugar a un elemento sensor que interactúa de forma evanescente con la parte del volumen de llenado que circunda inmediatamente la fibra. Moléculas receptoras pueden enlazarse a la superficie de fibra expuesta o al descubierto, y pueden llevarse a cabo ensayos de desplazamiento en emparejado o competitivos. Una onda luminosa se acoplará en el seno de la fibra, y una parte de la fluorescencia inducida de forma evanescente será acoplada de vuelta al seno de la fibra y propagada de vuelta a un detector. La señal procedente del analito diana, frente a las fuentes de fondo, es discriminada por su divergencia angular al salir de la fibra. Otras técnicas de fibra óptica, tales como la fluorescencia de fibra óptica, pueden adaptarse a los métodos divulgados en esta memoria utilizando ciertos de los mismos principios enunciados anteriormente.

Técnicas fotónicas adicionales tales como la interferometría incluyen la disposición de una guía de ondas de película delgada que tiene, por ejemplo, dos caminos, en el primero de los cuales puede haber inmovilizadas moléculas receptoras, mientras que el segundo está apantallado para proporcionar un canal de referencia. Puede acoplarse, por ejemplo, luz de láser al seno de la guía de ondas y dividirse para los dos caminos, de tal modo que es posible detectar los cambios en el índice de refracción y en el espesor de la capa de cubierta por el resultado de un desplazamiento de fase en el haz, que, a su vez, estará correlacionado con la cantidad de analito enlazado. Una variante de esta solución se identifica con el interferómetro de Hartmann, para el que se prepara una guía de ondas plana de película delgada multimodal de un único camino. Las moléculas receptoras pueden ser inmovilizadas en este camino, y la luz procedente de un láser puede ser acoplada en el seno de la guía de ondas de tal forma que dos modos se propagan por el camino. La óptica de las geometrías multimodales es tal, que el modo de orden más alto tiene un campo evanescente grande, lo que proporciona un mecanismo de señal, y el modo de orden más bajo no tiene prácticamente campo evanescente, lo que proporciona un mecanismo de referencia. El enlace con el analito diana provocará cambios relacionados en el índice de refracción y en el espesor de la capa de cubierta situada sobre el camino, que se detectarán por el campo evanescente del modo de orden más alto, que provoca un desplazamiento de fase en ese modo. Como el orden más bajo o modo de referencia es ciego para esos cambios, no se experimentará ningún desplazamiento de fase, y la diferencia medida entre los haces de señal y de referencia será susceptible de correlación para determinar la cantidad de analito enlazado.

Si bien la anterior explicación se ha dado tanto en términos generales como con cierto detalle, diversas técnicas disponibles en la tecnología de los sensores ópticos son adaptables a la práctica de la presente invención. Ha de comprenderse que la anterior exposición no es de ninguna manera exhaustiva ni limitativa, ya que pueden adoptarse una variedad de tecnologías existentes que medirán de forma satisfactoria diferencias de enlace y, en consecuencia, la presencia y cantidad de los marcadores respectivos de analitos de interés en esta memoria. Por supuesto, como se ha enfatizado anteriormente, sin importar la tecnología que se emplee, la práctica de los métodos divulgados en la presente memoria comprende la detección y medición simultáneas de al menos tres analitos.

Métodos inmunocromatográficos para la detección de PAMG-1

En lo que sigue, se describen realizaciones de los métodos para detectar PAMG-1 de acuerdo con la presente invención.

En una realización del método, se detecta PAMG-1 en una muestra a través del contacto de una muestra que contiene PAMG-1 con un sistema de inmunoensayo de acuerdo con los métodos divulgados en esta memoria, a fin de formar un complejo anticuerpo-PAMG-1. El complejo anticuerpo-PAMG-1 es entonces detectado. En una variante de esta realización, el anticuerpo incluye un marcador detectable, así como la etapa de detectar el complejo anticuerpo-PAMG-1, que incluye el marcador detectable.

En otra realización del método, la PAMG-1 es detectada en una muestra poniendo la muestra en contacto con un anticuerpo que tiene una afinidad de enlace específica elevada para la PAMG-1 (como el M271, puesto como ejemplo más adelante), con lo que se forma el complejo anticuerpo M271-PAMG-1. El complejo entra entonces en contacto con un segundo anticuerpo, inmovilizado (como, por ejemplo, el M52). El segundo anticuerpo es inmunológicamente distinto del primer anticuerpo (por ejemplo, se enlaza a un epítipo diferente), de manera que tales anticuerpos pueden enlazarse simultáneamente a la molécula de PAMG-1. El anticuerpo inmovilizado se enlaza al complejo de anticuerpo móvil y PAMG-1 para formar un complejo anticuerpo-PAMG-1-anticuerpo inmovilizado. La PAMG-1 se detecta detectando este complejo heterotrimero. Como se ha destacado anteriormente, se utiliza preferiblemente el anticuerpo con especificidad alta para PAMG-1 para el reconocimiento inicial de la PAMG-1.

Cuando el método anteriormente descrito incluye el uso de un único anticuerpo del par seleccionado, etiquetado con

un marcador detectable, una variante del método incluye poner la muestra en contacto con el primer anticuerpo etiquetado, antes de poner en contacto la muestra con el segundo anticuerpo, inmovilizado. En esta variante, el anticuerpo etiquetado sirve para enlazarse con la PAMG-1 de la muestra. Aún otra realización del método incluye las siguientes etapas: añadir una muestra de fluido que contiene PAMG-1 a una región de anticuerpo etiquetado y movilizable, hecha de material poroso que permite la migración de anticuerpos y proteínas a su través, de tal modo que la región de anticuerpo incluye un anticuerpo movilizable que tiene una elevada especificidad para la PAMG-1, de lo que resulta la fijación del anticuerpo a la PAMG-1 para formar un complejo de anticuerpo y PAMG-1; migración del complejo a la región de ensayo que contiene un segundo anticuerpo, inmovilizado en ella, teniendo este segundo anticuerpo afinidad de enlace para la PAMG-1, con el resultado de que el segundo anticuerpo se enlaza con el complejo anticuerpo etiquetado-PAMG-1 para formar un complejo inmovilizado; y detectar el complejo inmovilizado en la región de ensayo.

Aún otra realización del método consiste en un ensayo en emparejado estándar, en el que un anticuerpo no etiquetado es inmovilizado sobre una superficie cualquiera. La adición de muestra fluida que contiene PAMG-1 da como resultado el enlace de la PAMG-1 con el anticuerpo inmovilizado, a fin de formar un complejo anticuerpo-PAMG-1. La adición de anticuerpo etiquetado da lugar a la formación de un complejo inmovilizado compuesto de anticuerpo inmovilizado, PAMG-1 y anticuerpo etiquetado, y se detecta este complejo.

De acuerdo con los métodos anteriormente descritos, los anticuerpos pueden incluir un marcador o etiqueta detectable, de tal manera que la etapa de detectar el complejo anticuerpo-PAMG-1 o PAMG-1-anticuerpo incluye la detección del marcador o etiqueta detectable. Ejemplos de marcadores detectables que pueden utilizarse incluyen partículas manchadas, enzimas, pigmentos e isótopos radiactivos. En una realización específica, el marcador detectable es una partícula de oro manchada, por ejemplo, que tiene una dimensión promedio comprendida entre aproximadamente 20 nm y 30 nm. En aún otra realización, el marcador detectable es peroxidasa de rábano picante.

Dispositivos proporcionados a modo de ejemplo para la detección de PAMG-1

Se contemplan una variedad de dispositivos para la detección de la proteína PAMG-1 en una muestra. Dispositivos y/o métodos de acuerdo con la presente invención pueden, preferiblemente, detectar PAMG-1 en una muestra en la que la concentración de PAMG-1 se encuentra entre aproximadamente 1 ng/ml y 50 µg/ml, entre aproximadamente 2 ng/ml y 50 µg/ml, entre aproximadamente 3 ng/ml y 50 µg/ml, o entre aproximadamente 4 ng/ml y 50 µg/ml. Ejemplos no limitativos de dispositivos que pueden ser utilizados en los métodos divulgados en esta memoria se describen en la Patente de los EE.UU. N° 7.709.272, por Fuks et al. Dispositivos para uso en los presentes métodos también incluyen, por ejemplo, una cajeta que contiene una tira de ensayo (por ejemplo, con una región de almohadilla en la que se coloca la muestra, y una región de ensayo (en la que se leen los resultados)), y, opcionalmente, un temporizador incorporado y/o un emplazamiento para indicar la identificación de un paciente. La almohadilla y las regiones de ensayo se explican con mayor detalle más adelante. En ciertas realizaciones de los presentes métodos, el umbral de detección preferido de PAMG-1 se ajusta de manera que sea, al menos, aproximadamente 4 ng/ml. Ha de comprenderse que los métodos y dispositivos de la presente invención también abarcan umbrales de detección de PAMG-1 de aproximadamente al menos 1 ng/ml, aproximadamente al menos 2 ng/ml, y aproximadamente al menos 3 ng/ml.

Los dispositivos y métodos que se describen en esta memoria pueden adaptarse para ser utilizados fácilmente de un modo rápido y cómodo, por lo que se hace posible que los dispositivos y métodos sean utilizados en condiciones de paciente externa, o no internada. Por ejemplo, el método puede ser incorporado en un dispositivo fácil de utilizar que pueda ser hecho funcionar por una paciente con escasa o nula experiencia previa con el dispositivo. Esto hace que el método y el dispositivo sean altamente fiables y no muy susceptibles de errores de la operadora. El método puede también ser diseñado para permitir una simple determinación de 'sí' o 'no' (o de '+' o '-') con respecto a la presencia de PAMG-1 en una muestra (por ejemplo, una muestra de fluido vaginal).

En las Figuras 1 y 2 se ilustra un dispositivo no limitativo proporcionado a modo de ejemplo para la detección de PAMG-1. Para propósitos de ejemplificación, esta descripción hace referencia a anticuerpos monoclonales que se dan a modo de ejemplo más adelante. No es necesario, sin embargo, que se utilicen estos anticuerpos monoclonales específicos. El procedimiento de selección de, por ejemplo, un par de anticuerpos específicos de PAMG-1, tales como, por ejemplo, los descritos anteriormente, puede ser reproducido por un profesional con conocimientos ordinarios de la técnica.

Tal como se muestra en las Figuras 1 y 2, un dispositivo proporcionado a modo de ejemplo que puede ser utilizado para llevar a cabo los métodos descritos en la presente memoria, tiene un cuerpo en forma de tira compuesto de varios elementos interconectados o unidos entre sí secuencialmente. Más concretamente, la parte 12 del dispositivo comprende una almohadilla, que contiene una región 10 de anticuerpo M271 en la que los anticuerpos M271 están etiquetados, por ejemplo, por partículas manchadas SP ("stained particles") (no mostradas en los dibujos). La almohadilla 12 puede estar hecha de un tejido de fibra de vidrio o de cualquier otro material que sea poroso y permita la migración de diversas partículas y sustancias de una muestra. Las partículas manchadas pueden comprender partículas de oro que tienen una dimensión promedio comprendida dentro del intervalo entre 20 nm y 30 nm. La región de anticuerpo M271 también contiene inmunoglobulina IgG de ratón etiquetada con las mismas partículas manchadas. Los anticuerpos M271 etiquetados y la inmunoglobulina IgG de ratón se introducen dentro de la parte de banda 10 de la almohadilla 12 impregnando la almohadilla 12 con una solución de anticuerpos M271 etiquetados e IgG de ratón

etiquetada. La solución de anticuerpos M271 e inmunoglobulina IgG de ratón puede ser introducida en una membrana de nitrocelulosa 22 utilizando un lápiz de dibujo o un dispositivo de formación de microgotas. Unida a uno de los extremos de la almohadilla 12 según su dirección longitudinal, se encuentran [a] la membrana de nitrocelulosa 22, que contiene una región de ensayo 14 y una región de control 16. Tanto la región de ensayo 14 como la región de control 16 se han dispuesto transversalmente al dispositivo en toda su anchura. La región de ensayo 14 es una parte de banda de la membrana de nitrocelulosa 22. La región de ensayo 14 contiene anticuerpos M52 fijados a la membrana de nitrocelulosa 22. La región de control 16 contiene anticuerpos antiinmunoglobulina fijados a la membrana de nitrocelulosa 22. La región de control 16 cruza toda la anchura de la banda 22. Existe una membrana de papel de filtro 24, unida al extremo de la membrana de nitrocelulosa 22 que es opuesto al extremo de la membrana de nitrocelulosa 22 que está unido a la almohadilla 12. Una membrana de papel de filtro 24 está unida al extremo de la tira de nitrocelulosa 22 en su dirección longitudinal. La superficie del dispositivo está revestida con películas protectoras especiales 28 y 30, por ejemplo, delgadas cintas adhesivas especialmente diseñadas para dispositivos de tira. Se han trazado unas flechas 18 sobre superficie de la película 28 con el fin de mostrar el extremo de aplicación de muestra de la almohadilla 12. La almohadilla 12, la membrana de nitrocelulosa 22 y la tira de papel de filtro 24 están fijadas a una base de plástico rígido y adhesivo 26.

En la realización descrita en esta sección, el dispositivo incluye una región de almohadilla 10 de anticuerpo M271 constituida por una matriz de aplicación de muestra porosa que permite la migración de anticuerpos y proteínas a su través. La región 10 de anticuerpo M271 incluye el anticuerpo M271, que es capaz de enlazarse con una elevada especificidad a la PAMG-1. La presentación de una muestra de fluido que contiene PAMG-1 a la región de anticuerpo M271 da como resultado la fijación del anticuerpo M271 a la PAMG-1 para formar el complejo anticuerpo M271-PAMG-1. El dispositivo también incluye una región de ensayo 14 en comunicación de fluido con la región 10 de anticuerpo M271, hecha de un material poroso que permite la migración de anticuerpo y proteínas a su través. La región de ensayo 14 incluye el anticuerpo M52 inmovilizado en la región de ensayo 14, que es también capaz de enlazarse a la PAMG-1. El anticuerpo M52 es inmunológicamente distinto del anticuerpo M271, de tal manera que los anticuerpos M271 y M52 pueden enlazarse simultáneamente con la PAMG-1. La presentación de una muestra de fluido a la región 10 de anticuerpo M271 tiene como resultado la migración del complejo anticuerpo M271-PAMG-1 al interior de la región de ensayo 14, donde el complejo anticuerpo M271-PAMG-1 se enlaza con el anticuerpo M52 y es inmovilizado en la región de ensayo por el anticuerpo M52. El dispositivo detecta la PAMG-1 en una muestra basándose en la presencia del anticuerpo M52 inmovilizado en la región de ensayo 14. Como resultado de ello, únicamente la PAMG-1 forma un complejo anticuerpo M271-PAMG-1-anticuerpo M52, que queda inmovilizado en la región de ensayo 14. De esta forma, la presencia del anticuerpo M52 inmovilizado en la región de ensayo 14 es indicativa de la presencia de PAMG-1 en la muestra.

En esta realización de dispositivo para detectar PAMG-1 en secreciones vaginales, el anticuerpo M271 es fijado a un marcador detectable que se utiliza para detectar la PAMG-1 inmovilizada en la región de ensayo 14. Ejemplos de marcadores detectables incluyen partículas manchadas, enzimas, pigmentos, pigmentos fluorescentes e isótopos radiactivos, si bien no están limitados por estos. En una realización, el marcador detectable consiste en partículas de oro que tienen una dimensión promedio entre aproximadamente 20 nm y 30 nm. En una realización, el anticuerpo M271 es un anticuerpo etiquetado en un estado secado por congelación.

En una variante de la realización en la que el anticuerpo M271 de la región de almohadilla para anticuerpo M271 es etiquetado con un marcador detectable, el dispositivo incluye, de manera adicional, una región de ensayo que contiene el anticuerpo M52. La región de almohadilla y la región de ensayo están en comunicación de fluido.

En aún otra realización del dispositivo, también materializada con el dispositivo ilustrado en las Figuras 1 y 2, el dispositivo tiene un cuerpo en forma de tira con extremos proximal, o más cercano, y distal, o más alejado. La región 10 de anticuerpo M271 del cuerpo en forma de tira está hecha de un material que permite la migración de anticuerpos y proteínas a su través. La región 10 de anticuerpo M271 del cuerpo en forma de tira incluye el anticuerpo M271, que tiene una afinidad de enlace altamente específica con la PAMG-1, de manera que la presentación a la región de almohadilla de anticuerpo M271 de una muestra de fluido que contiene PAMG-1 da lugar a la fijación del anticuerpo M271 a la PAMG-1 para formar el complejo anticuerpo M271-PAMG-1.

El cuerpo en forma de tira también incluye una región de ensayo 14, que es proximal a la región 10 de anticuerpo M271 y está en comunicación de fluido con la región 10 de anticuerpo M271. La región de ensayo 14 está hecha de un material que permite la migración de anticuerpo y proteínas a su través. La región de ensayo 14 incluye el anticuerpo M52, inmovilizado en la región de ensayo 14, el cual tiene afinidad de enlace para la PAMG-1, de manera que la presentación de la muestra de fluido a la región 10 de anticuerpo M271 da como resultado la migración del complejo anticuerpo M271-PAMG-1 a la región de ensayo 14, en la que el complejo anticuerpo M271-PAMG-1 se enlaza con el anticuerpo M52 y es inmovilizado en la región de ensayo 14 por el anticuerpo M52. La región de ensayo puede también incluir anticuerpo M42 y anticuerpo M52, inmovilizados en la región de ensayo 14. El dispositivo detecta PAMG-1 en una muestra basándose en la inmovilización del complejo anticuerpo M271 etiquetado-PAMG-1 en la región de ensayo 14. El uso de diversas combinaciones de anticuerpos específicos de PAMG-1 (por ejemplo, el M42 y el M52), inmovilizados en la región de ensayo, ejemplifica una manera de ajustar el umbral de sensibilidad (umbral de detección) del dispositivo de tira (véase la Patente de los EE.UU. N° 7.709.272, por Fuks et al.). Sin embargo, el profesional con conocimientos ordinarios de la técnica apreciará que son posibles otros métodos para ajustar el umbral de detección (por ejemplo, variar la afinidad de enlace de los anticuerpos inmovilizados a inmovilizables de un par de

anticuerpos específicos de PAMG-1 y/o ajustar el procedimiento, por ejemplo, la regulación temporal procedimental de las etapas del procedimiento de ensayo, tal y como se divulga en esta memoria).

Región de control. El dispositivo puede incluir una región de control estándar 16 (Figuras 1 y 2), Esta región de control sirve para confirmar el adecuado funcionamiento del dispositivo. Es posible utilizar también, sin embargo, cualesquiera diseños de región de control alternativos con un dispositivo para uso en los métodos divulgados en esta memoria.

Por ejemplo, un dispositivo con una única región de control puede incluir la región 10 de anticuerpo M271 hecha de un material que permite la migración de anticuerpos y proteínas a su través, de tal manera que la región 10 de anticuerpo M271 incluye un anticuerpo M271 etiquetado que no está inmovilizado en su interior y tiene una alta especificidad para la PAMG-1, de forma que la presentación de la región 10 de almohadilla de anticuerpo M271 de una muestra de fluido que contiene PAMG-1 da como resultado que el anticuerpo M271 se enlaza con la PAMG-1 para formar un complejo anticuerpo M271-PAMG-1. El dispositivo puede también incluir una región de ensayo 14 en comunicación de fluido con la región 10 de anticuerpo M271, que está hecha de un material que permite la migración de anticuerpos y proteínas a su través. La región de ensayo 14 también incluye el anticuerpo M52, inmovilizado en la región de ensayo 14, que tiene una afinidad de enlace por la PAMG-1. El anticuerpo M52 es inmunológicamente distinto del anticuerpo M271, de tal modo que los anticuerpos M271 y M52 pueden enlazarse simultáneamente con la PAMG-1. La presentación de la muestra de fluido a la región 10 de anticuerpo M271 da como resultado la migración del complejo anticuerpo M271-PAMG-1 al interior de la región de ensayo 14, donde el complejo anticuerpo M271-PAMG-1 se enlaza con el anticuerpo M52 y es inmovilizado en la región de ensayo 14 por el anticuerpo M52. El dispositivo detecta PAMG-1 en una muestra basándose en la inmovilización del anticuerpo M271 etiquetado de la región de ensayo 14. Cuando está presente una baja concentración de PAMG-1 en la muestra, al menos algo de los anticuerpos M271 etiquetados migra de la región 10 de anticuerpo M271, a través de la región de ensayo 14, a región de control 16. Se inmovilizan anticuerpo antirratón antiinmunoglobulina en la región de control 16. Los anticuerpos antiinmunoglobulina se enlazan con anticuerpos M271 etiquetados que manchan la región de control. Si una alta concentración de PAMG-1 está presente en la muestra, entonces tan solo una pequeña cantidad de anticuerpos M271 etiquetados pueden acercarse a la región de control 16, y la coloración de la región de control puede ser demasiado débil como para hacerse visible para una persona a simple vista. A fin de evitar tal posibilidad, se añadió inmunoglobulina IgG de ratón etiquetada a la región 10 de anticuerpo M271. Esta inmunoglobulina no se enlaza con PAMG-1 y migra libremente a través de la región de ensayo 14 de anticuerpo M52, hasta la región de control 16, donde es enlazada por anticuerpos de antiglobulina antirratón y mancha la región de control 16. La región de control confirma el apropiado funcionamiento del dispositivo independientemente de la concentración de PAMG-1 en la muestra.

Aún otra componente del dispositivo puede ser un material poroso que está en comunicación porosa estrecha con material de la región de ensayo. Esta parte del dispositivo trabaja como una bomba que ayuda a desplazar líquidos, proteínas y anticuerpos a su través. Ejemplos de marcadores detectables que pueden ser utilizados para el etiquetado de anticuerpos de ratón e inmunoglobulina IgG incluyen partículas manchadas, enzimas, pigmentos e isótopos radiactivos, si bien no están limitados por estos. En una realización, el marcador detectable es un pigmento fluorescente. En aún otra realización, los marcadores detectables son partículas manchadas. En una realización, el anticuerpo M271, que es un anticuerpo etiquetado, y la inmunoglobulina IgG de ratón etiquetada se encuentran en un estado secado por congelación.

Los materiales que se utilizan en las diversas regiones del dispositivo anteriormente descrito pueden ser cualquier combinación de materiales que permita la migración de anticuerpos y proteínas a su través. Ejemplos de materiales adecuados incluyen fibra de vidrio, plástico poroso, nitrocelulosa y papel de filtro, si bien no están limitados por estos.

Las partes de un dispositivo para uso en un método divulgado en esta memoria pueden ser colocadas en cualquier combinación funcional (por ejemplo, en un dispositivo de flujo lateral, cajeta, etc.), siempre y cuando la PAMG-1 pueda ser detectada en la muestra cuando está presente en una concentración de al menos un umbral de detección predefinido (por ejemplo, 4 ng/ml).

Dispositivos para uso en los presentes métodos pueden, opcionalmente, incluir una película protectora que cubre al menos una parte del dispositivo. Esta puede ser transparente o no transparente y puede tener la necesaria marca comercial, marcas / signos de información o flechas en su superficie.

50 Recogida de muestras

En los métodos que se divulgan en esta memoria, es necesario recoger una muestra de fluido vaginal de una paciente. El dispositivo o herramienta, u otros medios que se utilicen para recoger la muestra, así como para transferir la muestra a una solución (para su ensayo), pueden variarse de acuerdo con la presente invención, a condición de que la muestra se recoja. Ejemplos no limitativos de dispositivos para recoger muestras de fluido vaginal (por ejemplo, una muestra de fluido vaginal que contiene PAMG-1), incluyen, por ejemplo, hisopos vaginales (por ejemplo, hisopos vaginales mullidos).

Ejemplos no limitativos de otros medios para recoger una muestra de fluido vaginal incluyen, por ejemplo, el método de la ducha o lavado vaginal. Puede utilizarse una jeringa para recoger la muestra de fluido vaginal.

El dispositivo y/o métodos específicos de recogida de muestras pueden variarse, y es posible utilizar cualquier dispositivo o método adecuado conocido en la técnica, siempre y cuando la muestra de fluido vaginal sea recogida satisfactoriamente. De preferencia, el dispositivo o los medios de recogida de muestras obtiene como resultado al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, o más, del objetivo del análisis contenido en la muestra (por ejemplo, PAMG-1). Por ejemplo, el hisopo vaginal mullido que se utiliza en los presentes Ejemplos arroja como resultado aproximadamente entre el 80% y el 90% de la PAMG-1, tras su recogida y transferencia a una solución.

En ciertas realizaciones, el dispositivo o los medios utilizados para recoger la muestra de fluido vaginal proporcionan una dilución de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 o 1:10 de la muestra de fluido vaginal. En ciertas realizaciones, el dispositivo o los medios utilizados para recoger la muestra de fluido vaginal proporcionan una dilución de la muestra de fluido vaginal dentro del intervalo entre 1:1 y 1:10, 1:2 y 1:9, 1:2 y 1:8, 1:2 y 1:7, 1:2 y 1:6, 1:2 y 1:5, 1:2 y 1:4, 1:2 y 1:3, 1:3 y 1:10, 1:3 y 1:9, 1:3 y 1:8, 1:3 y 1:7, 1:3 y 1:6, 1:4 y 1:7 o 1:5 y 1:6.

En una realización específica, un hisopo vaginal proporciona aproximadamente una dilución a 1:4 de la muestra de fluido vaginal. En otra realización, un hisopo vaginal mullido proporciona una dilución a aproximadamente 1:4 de la muestra de fluido vaginal.

Conjuntos

La presente invención también proporciona juegos o conjuntos. Un conjunto divulgado en esta memoria comprende un dispositivo, por ejemplo, como el divulgado en la presente memoria (por ejemplo, un dispositivo de flujo lateral) para detectar la presencia de PAMG-1 en una muestra de fluido vaginal cuando está presente en una cantidad por encima de un umbral de detección predeterminado (por ejemplo, 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 2 ng/ml, 3 ng/ml o 4 ng/ml). Un conjunto divulgado en esta memoria comprende un dispositivo (tal como un dispositivo de flujo lateral, por ejemplo, tal como un dispositivo similar al que se describe en la Patente de los EE.UU. N° 7.709.272, si bien no está limitado por este) para detectar la presencia de PAMG-1 en una muestra de fluido vaginal cuando está presente en una cantidad por encima de un umbral predeterminado (por ejemplo, 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 2 ng/ml, 3 ng/ml o 4 ng/ml); y unos medios para recoger una muestra de fluido vaginal (por ejemplo, un hisopo vaginal, tal como un hisopo vaginal como se describe en esta memoria (por ejemplo, un hisopo vaginal mullido), una jeringa, un conjunto de ducha u otro dispositivo adecuado para recoger la muestra, si bien no están limitados por estos). En ciertos aspectos, los medios para recoger la muestra de fluido vaginal pueden, opcionalmente, ser utilizados para diluir la muestra de fluido vaginal (por ejemplo, al 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, o, por ejemplo, dentro del intervalo entre 1:1 y 1:10, 1:2 y 1:9, 1:2 y 1:8, 1:2 y 1:7, 1:2 y 1:6, 1:2 y 1:5, 1:2 y 1:4, 1:2 y 1:3, 1:3 y 1:10, 1:3 y 1:9, 1:3 y 1:8, 1:3 y 1:7, 1:3 y 1:6, 1:4 y 1:7 o 1:5 y 1:6, etc.). Los conjuntos pueden también comprender un disolvente para transferir la muestra de fluido vaginal (por ejemplo, que contiene un analito, por ejemplo, PAMG-1), por ejemplo, una solución que contiene el 0,9% de NaCl, el 0,01% de Triton X100, el 0,05% de NaN₃). El disolvente puede estar contenido dentro de un vial que puede también ser utilizado como aplicador del disolvente, y la muestra de fluido vaginal puede ser aplicada directamente sobre un dispositivo de flujo lateral. Un conjunto puede también comprender una cajeta que contiene una tira de ensayo (por ejemplo, con una región de almohadilla en la que se coloca la muestra, y una región de ensayo (en la que se leen los resultados)), y, opcionalmente, un temporizador incorporado y/o un emplazamiento para la identificación de la paciente. Los conjuntos descritos en esta memoria pueden, adicionalmente, comprender uno o más viales (por ejemplo, un vial de plástico) y/o instrucciones para su uso. Por ejemplo, las instrucciones de uso pueden incluir directrices para el diagnóstico del TTD basándose en los resultados del ensayo. Los conjuntos pueden comprender también un desecante. Un conjunto puede también comprender un temporizador, por ejemplo, incorporado dentro del dispositivo de ensayo o como una unidad independiente. Las instrucciones de uso pueden, además de ello o alternativamente, contener instrucciones para el diagnóstico del riesgo de rotura espontánea de las membranas fetales (ROM) (por ejemplo, ROM prematura, antes de tiempo) y/o del riesgo de alumbramiento prematuro. Los conjuntos pueden comprender un dispositivo como se ilustra en las Figuras 1 y 2.

Recogida de muestras y procedimiento de ensayo

En general, los métodos y conjuntos que se divulgan en esta memoria pueden ser utilizados para recoger especímenes (muestras de fluido vaginal) de pacientes que presentan signos, síntomas o molestias que sugieren un parto prematuro. De preferencia, el espécimen se recoge previamente al examen dactilar o a la aplicación de lubricantes, y antes del uso de cualesquiera soluciones desinfectantes o medicinas, o bien 6 horas después de haberlas retirado. El espécimen puede ser recogido en presencia de mixturas con sangre no significativas. Los métodos divulgados en esta memoria pueden llevarse a cabo incluso con cantidades de trazas de sangre en el dispositivo de recogida (por ejemplo, un hisopo). El espécimen puede también ser recogido si están presentes orina, semen o infecciones vaginales, y puede ser recogido de pacientes con un tiempo de gestación de entre 20 y 36 semanas y 6 días. No es necesario, por otra parte, un examen con espéculo.

Es posible utilizar los siguientes métodos para la recogida de una muestra de fluido vaginal de una mujer embarazada y el ensayo de la muestra en busca de la presencia de PAMG-1 (por ejemplo, para la predicción del TTD y/o para la determinación del riesgo para una paciente de parto prematuro y/o de ROM espontánea), de acuerdo con la presente invención. Aunque el experto de la técnica apreciará que es posible utilizar diferentes métodos y/o dispositivos de ensayo para conseguir los mismos resultados, tal y como se divulgan en esta memoria y se encuentran también

abarcados por la presente invención.

Recogida de muestras

En un ejemplo de prueba de acuerdo con los presentes métodos, una muestra de descarga cervicovaginal recogida mediante un hisopo vaginal es extraída e introducida en disolvente, como sigue:

- 5 Tómesese el vial de disolvente (por ejemplo, que contiene: el 0,9% de NaCl, el 0,01% de Triton X100, el 0,05% de NaN₃) por su tapa y agítese bien para asegurarse de que todo el líquido contenido en el vial cae al fondo. Abrir el vial de disolvente y colocarlo en posición vertical. Para recoger una muestra de la superficie de la vagina, es posible utilizar un hisopo vaginal (por ejemplo, un hisopo mullido y estéril) u otro dispositivo de recogida adecuado o medios para recoger la muestra de fluido vaginal, tal y como se ha divulgado en lo anterior. Para el hisopo vaginal, la punta del hisopo no debe tocar nada antes de su inserción en la vagina. Sujétese el hisopo por la mitad del palo y, mientras la paciente está tendida sobre su espalda, insértese la punta de hisopo del hisopo en la vagina hasta que los dedos contacten con la piel, no más de aproximadamente 5-7 cm (entre 2 y 3 pulgadas) de profundidad. Retírese el hisopo de la vagina tras transcurridos aproximadamente 30 segundos (u otros lapsos de tiempo, por ejemplo, aproximadamente 10, 20, 40, 50, 60, 90, 120 segundos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, etc.). Colóquese la punta del hisopo dentro del vial y enjuáguese el isopo en el disolvente (por ejemplo, en 0,55 ml de disolvente) haciéndolo rotar aproximadamente 30 segundos (u otros lapsos de tiempo, por ejemplo, aproximadamente 10, 20, 40, 50, 60, 90, 120 segundos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, etc.). Retírese y deséchese el hisopo. El profesional experto apreciará que los anteriores procedimiento y recogida de muestra, así como los tiempos de transferencia de la muestra a disolvente, pueden variar en caso de que se utilicen otro(s) dispositivo(s) y/o medios o métodos para recoger la muestra de fluido vaginal. Otros tales dispositivos y procedimientos, y regulación temporal de los procedimientos, se encuentran también abarcados por los presentes métodos.

Procedimiento de ensayo (detección de PAMG-1)

- Seguidamente a la transferencia de la muestra de fluido vaginal obtenida del paciente a una solución (por ejemplo, al enjuagar el hisopo en el disolvente), póngase en contacto un dispositivo de ensayo de PAMG-1, por ejemplo, como se divulga en la presente memoria, por ejemplo, un dispositivo de flujo lateral, con el disolvente. En una realización, la muestra fluye de una almohadilla absorbente a una membrana de nitrocelulosa, pasando a través de un área reactiva que contiene anticuerpos anti-PAMG-1 monoclonales conjugados con una partícula de oro. El complejo antígeno-anticuerpo fluye hasta la región de ensayo, donde es inmovilizado por un segundo anticuerpo anti-PAMG-1. Este suceso lleva consigo la aparición de una línea de ensayo. Los complejos antígeno-anticuerpo no enlazados continúan fluyendo a lo largo de la tira de ensayo y son inmovilizados por un segundo anticuerpo. Esto lleva consigo la aparición de una línea de control interno. En una realización, la tira de ensayo se sumerge en el vial con disolvente durante aproximadamente 5 minutos (se contemplan también en esta memoria otros lapsos de tiempo, por ejemplo, de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 minutos, dependiendo de las condiciones concretas de la prueba y del método o dispositivo específico que se utilice para ensayar la muestra). La tira de ensayo puede ser retirada tan pronto sean claramente visibles dos franjas en el vial (en aproximadamente 5 minutos). Los resultados pueden ser entonces leídos (por ejemplo, mediante la colocación de la prueba en una superficie limpia, seca y plana). En una realización, la presencia de dos líneas indica un resultado de la prueba positivo (PAMG-1 detectada), y la presencia de una única línea indica un resultado negativo. El profesional experto apreciará que las anteriores etapas de procedimiento y la regulación de su secuencia temporal se proporcionan únicamente a modo de ejemplo y no son limitativas.

- 40 Tal y como se ha explicado anteriormente, ha de comprenderse que variantes de este procedimiento están también englobadas por la presente invención, en tanto en cuanto den como resultado la detección de PAMG-1 en la muestra de fluido vaginal cuando esté presente en un umbral de detección predefinido (por ejemplo, de aproximadamente al menos 4 ng/ml, aproximadamente al menos 3 ng/ml, aproximadamente al menos 2 ng/ml o aproximadamente al menos 1 ng/ml). Así, pues, por ejemplo, el tipo y el volumen del disolvente, del dispositivo o de los medios para la recogida de la muestra, así como del dispositivo de detección de PAMG-1, pueden ser modificados o completamente diferentes con respecto a los divulgados en los ejemplos de esta memoria. Los tiempos de incubación anteriores, por ejemplo, los 30 segundos de recogida de muestra con hisopo y 30 segundos de enjuague del hisopo en disolvente pueden variar dependiendo del procedimiento y dispositivo de ensayo específicos utilizados. El lugar de recogida de la muestra de fluido vaginal puede variar y puede ser determinado por una persona con conocimientos ordinarios de la técnica. A modo de ejemplo no limitativo, lugares proporcionados a modo de ejemplo de recogida de muestras de fluido vaginal incluyen la recogida de, por ejemplo, el os cervical, el canal cervical, el fórnix posterior, la cavidad / canal vaginal. La recogida de la muestra puede ser ciega (por ejemplo, puede recogerse de la vagina sin necesidad de utilizar un espéculo).

- De acuerdo con la presente invención, puede emplearse biología molecular convencional, microbiología, ADN recombinatorio, inmunología, biología celular y otras técnicas relacionadas dentro del conocimiento de la técnica. Véase, por ejemplo, la divulgación de Sambrook et al. (2001): "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Clonaje molecular: un manual de laboratorio), 3ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N. Y. [Nueva York]; la divulgación de Sambrook et al. (1989): "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N. Y.; la divulgación de Ausubel et al., eds. (2005): "Current Protocols in Molecular Biology" (Protocolos actuales de biología molecular). John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, N. J.; Bonifacino

et al., eds. (2005): "Current protocols in Cell Biology" (Protocolos actuales de biología celular). John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, N. J.; Coligan et al., eds. (2005): "Current Protocols in Immunology" (Protocolos actuales de inmunología), John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, N. J.; Coico et al., eds. (2005): "Current protocols in Microbiology" (Protocolos actuales de microbiología), John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, N. J.; Coligan et al., eds. (2005): "Current Protocols in Protein Science" (Protocolos actuales de ciencia de proteínas), John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, N.J.; Enna et al., eds. (2005): "Current Protocols in Pharmacology" (Protocolos actuales de farmacología), John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, N. J.; Hames et al., eds. (1999): "Protein Expression: A Practical Approach" (Expresión de proteínas: un enfoque práctico). Oxford University Press: Oxford; Freshney (2000): "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique" (Cultivo de células animales: un manual de la técnica básica). 4ª ed. Wiley -Liss; entre otras. Los actuales protocolos listados en lo anterior se actualizan varias veces al año.

Los siguientes ejemplos tienen la intención de ilustrar la presente invención, no de limitarla.

Ejemplos

Ejemplo 1: Conjunto de detección de PAMG-1 (Prueba de TTD)

Se preparó conjunto para la detección de PAMG-1 con un umbral de detección de 4 ng/ml. El conjunto incluía un dispositivo de diagnóstico que empleaba anticuerpos monoclonales que detectan la presencia de PAMG-1 en secreciones cervicovaginales, tal y como se describe en detalle en la Patente de los EE.UU. N° 7.709.272, por Fuks et al. El dispositivo de diagnóstico se ilustra en las Figuras 1 y 2. El dispositivo de diagnóstico puede, en sí mismo, detectar PAMG-1 cuando esta está presente en una concentración de al menos 1 ng/ml en la muestra. El conjunto también incluía un hisopo vaginal mullido con las siguientes especificaciones: longitud del vástago de plástico: 170,0 mm ± 1 mm; diámetro de la punta de plástico: 4,6 mm ± 0,1 mm; diámetro de la parte de mango de palo: 4,4 mm ± 0,2 mm; longitud de la punta de fibra: 22 mm ± 3 mm; diámetro de la punta mullida: 7,00 mm ± 1,5 mm; longitud total: 171 mm ± 2 mm. El conjunto incluye, adicionalmente, instrucciones para la recogida de las muestras y el procedimiento de ensayo. La recogida de las muestras y el procedimiento de ensayo incluían una saturación del hisopo de 30 segundos dentro de la vagina (no era necesario un examen con espéculo estéril), una etapa de lavado activo de 30 segundos, por lo que el hisopo, según era extraído de la vagina, se hacía rotar activamente dentro de un vial lleno de disolvente, y se dejaba un tiempo de espera de 5 minutos desde el momento en que el hisopo era extraído, y se insertaba la tira de ensayo si no aparecían antes dos líneas de ensayo. Durante el procedimiento de ensayo, la PAMG-1 presente en la muestra se enlazaba secuencialmente a anticuerpo monoclonal conjugado con partículas etiquetadas y, después, a anticuerpo monoclonal inmovilizado en un portador insoluble. El umbral de detección de sensibilidad in vivo de la PAMG-1 se ajustó en 4 ng/ml utilizando la recogida de muestra y el procedimiento de ensayo de TTD específicos que se describen más adelante.

Recogida de muestra y procedimiento de ensayo de TTD:

1. Tomar el vial de disolvente (que contiene: 0,9% de NaCl, 0,01% de Triton X100, 0,05% de NaN₃) por su tapa y sacudirlo bien para asegurarse de que todo el líquido del vial ha caído al fondo. Abrir el vial de disolvente y colocarlo en posición vertical.
2. Para recoger una muestra de la vagina, utilizar el hisopo mullido y estéril proporcionado en el conjunto de TTD. Extraer el hisopo mullido y estéril de su paquete siguiendo las instrucciones del paquete. La punta del hisopo no debe tocar nada antes de su inserción en la vagina. Sujetar el hisopo por la parte media del palo y, mientras la paciente está tendida sobre su espalda, insertar cuidadosamente la punta del hisopo dentro de la vagina hasta que los dedos entren en contacto con la piel, no más de 5-7 cm (entre 2 y 3 pulgadas) de profundidad. Extraer el hisopo de la vagina después de 30 segundos.
3. Colocar la punta del hisopo dentro del vial y enjuagar el vial en el disolvente haciéndolo rotar durante 30 segundos. Retirar el hisopo y desecharlo.
4. Abrir por desgarró la bolsa de hoja metálica por las muescas de desgarró y extraer la tira de ensayo de PAMG-1.
5. Sumergir el extremo blanco de la tira de ensayo (marcado con flechas) dentro del vial con disolvente durante no más de 5 minutos.
6. Extraer la tira de ensayo en el caso de que sean claramente visibles dos franjas en el vial (no más tarde de 5 minutos escasos). Leer los resultados colocando la prueba en una superficie limpia, seca y plana.
7. No leer o interpretar los resultados una vez hayan transcurrido 10 minutos desde la inmersión de la tira de ensayo dentro del vial.
8. La presencia de dos líneas indica un resultado positivo de la prueba (positivo para la PAMG-1) y la presencia de una sola línea indica un resultado negativo de la prueba (negativo para la PAMG-1).

Ejemplo 2: Prueba clínica para predecir el tiempo hasta el parto (TTD)

5 A fin de evaluar la eficacia del conjunto de prueba de TTD para la predicción del TTD, se condujo una prueba clínica de observación prospectiva utilizando el conjunto de detección de PAMG-1 descrito en el Ejemplo 1 anterior (al que se hace referencia más adelante como Conjunto de Prueba de TTD –“TTD Test Kit”–), basándose en la detección de PAMG-1 en las secreciones cervicovaginales de mujeres embarazadas con un tiempo de gestación entre 20^{0/7} y 36^{6/7} semanas (20 semanas y 0 días, y 36 semanas y seis días), que presentaban signos y síntomas de PTL y que tenían sus membranas clínicamente intactas.

Diseño de estudio:

Se utiliza el siguiente diseño de estudio:

1. *Las determinaciones se estratifican por los siguientes intervalos de tiempo de gestación:*

- 10 a. < 22 semanas
 b. 22-34^{6/7} semanas
 c. 35-36^{6/7} semanas

El conjunto de TTD para la detección de PAMG-1 se compara con otros métodos disponibles para la determinación del tiempo hasta el parto en la misma población de pacientes, que incluyen:

- 15 a. mediciones de longitud cervical por ultrasonidos transvaginales (< 30 cm)
 b. dilatación cervical > 1 cm
 c. frecuencia de las contracciones ≥ 8 cada hora

2. *Análisis de los datos*

20 Se determina la asociación entre los resultados de la prueba de TTD, la longitud cervical y las consecuencias siguientes:

- a. Alumbramiento a < 37 semanas de gestación
 b. Admisión a la unidad de cuidados intensivos de neonatos (NICU –“neonatal intensive care unit”–)
 c. Corioanmiotitis histológica
 d. Funisitis
 25 e. Síndrome de dificultad respiratoria
 f. Conducto arterioso persistente
 g. Sepsis neonatal
 h. Peso al nacer
 i. Muerte perinatal

30 3. *Selección y descarte de sujetos:*

Se utilizaron los siguientes criterios de inclusión y de exclusión:

Criterios de inclusión: Mujeres entre 20^{0/7} y 36^{6/7} semanas de gestación con una dilatación cervical ≥ 3 cm, que se presentaban con signos, síntomas o molestias por ellas referidos que sugerían un parto prematuro (destacados más adelante), fueron invitadas a participar en la prueba:

- 35 a. Contracciones el útero, con o sin dolor
 b. Dolor intermitente del abdomen bajo
 c. Dolor de espalda sordo
 d. Presión pélvica
 e. Sangrado durante el segundo o tercer trimestre
 40 f. Calambres como los menstruales, o intestinales, con o sin diarrea

g. Ausencia de pérdidas del os cervical, observado mediante un examen con espéculo estéril

Criterios de exclusión: Durante el examen clínico de admisión, los sujetos que se encontró que tenían uno de entre los siguientes puntos se consideraron no elegibles y no se incluyeron en el análisis:

- 5 a. Se presentaban con molestias y síntomas a cuidados obstétricos programados de forma regular (es decir, los síntomas no eran lo bastante acusados, en opinión de la paciente, como para merecer una evaluación de emergencia, no programada, sobre su estado, tal como se le proporcionaría en una unidad hospitalaria de paritorio y maternidad o en una sala de emergencias)
- b. Recibieron medicaciones tocolíticas para el tratamiento de la amenaza de alumbramiento prematuro, antes de la recogida de especímenes cervicovaginales o de mediciones de la longitud cervical
- 10 c. Dilatación cervical > 3 centímetros
- d. Con sospechas de placenta previa
- e. < 20^{0/7} semanas de gestación o ≥ 37 semanas de gestación
- f. Rotura abierta de las membranas fetales (ROM), según se indica por la pérdida observada de fluido desde el os cervical
- 15 g. cerclaje cervical colocado
- h. un síntoma no asociado con el alumbramiento prematuro con amenaza idiopática (por ejemplo, trauma)
- i. examen digital previo a la recogida de espécimen
- j. participación en un estudio tocolítico
- k. fuerte sangrado vaginal
- 20 l. menor de 18 años y aún no emancipada de consentimiento

Todas las pacientes que experimentan una aceleración de los esfuerzos del parto para mejorar la progresión del parto o que han tenido un alumbramiento por cesárea antes de que se haya diagnosticado un parto activo (definido como contracciones regulares cada 10 minutos o menos y que duran más de 40 segundos, con borramiento cervical de más del 80 por ciento y una dilatación de 2 cm (o 3 cm)) no se incluyen en el análisis.

25 *4. Conclusiones finales*

Se determinaron la sensibilidad (SN), la especificidad (SN), el valor predictivo positivo (PPV) y el valor predictivo negativo (NPV) para la prueba de TTD, las mediciones de la longitud cervical por ultrasonidos transvaginales (< 30 mm), la dilatación cervical > 1 cm y la frecuencia de las contracciones ≥ 8 cada hora para los siguientes intervalos de tiempo de presentación hasta el parto:

- 30 a. ≤ 48 horas
- b. ≤ 7 días
- c. ≤ 14 días

5. Procedimiento de estudio

Se sigue el siguiente procedimiento de estudio:

- 35 a. Se pide consentimiento a pacientes que presentaban signos y síntomas de PTL y que no refieren relaciones sexuales en las 24 horas previas, y que se encontraban entre las 20^{0/7} y las 36^{6/7} semanas de gestación.
- b. Se recoge un espécimen para la prueba de TTD (tal y como se describe en el Ejemplo 1 anterior), antes de la inserción de un espéculo estéril para examen de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.
- 40 c. La muestra es apropiadamente etiquetada y almacenada en un lugar especialmente designado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, para su ulterior examen por un investigador independiente que no tiene conocimiento de los resultados de la evaluación clínica normal del profesional médico.
- d. Tras recoger la muestra antes indicada, el profesional médico completa el examen físico de la paciente para determinar si la paciente habrá de incluirse o excluirse de la prueba clínica, basándose en los criterios de inclusión y de exclusión expuestos en lo anterior.

e. El profesional médico registra los hallazgos.

f. Se lleva a cabo la medición de la longitud cervical mediante ultrasonidos transvaginales (TVU –“transvaginal ultrasound”–) y se registran los resultados.

g. Se registran datos de alumbramiento de la paciente (por ejemplo, hora, estado, etc.).

5 h. La muestra recogida se ensaya utilizando la prueba de TTD descrita en el Ejemplo 1.

6. *Análisis estadístico*

10 Se utilizan la prueba de Mann-Whitney, el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier y la regresión de Cox para la evaluación de los resultados principales. Se calculan el PPV, NPV, SN, SP para la prueba de TTD (para todos los puntos objeto del ensayo). Se computan intervalos de confianza (CI) del 95% utilizando el procedimiento de Clopper-Pearson.

7. *Diagnóstico sobre el terreno y gestión de una paciente en parto prematuro confirmado*

De acuerdo con el ACOG Practice Bulletin (Boletín de prácticas de ACOG) publicado en la Management of Preterm Labor (Gestión del parto prematuro) (2003), la paciente diagnosticada de PTL puede ser tratada con uno o más de los tratamientos siguientes:

15 a. Terapia tocolítica

b. Antibióticos

c. Reposo en cama

d. Corticosteroides

20 De las posibles combinaciones anteriores de opciones de diagnóstico y de tratamiento listadas en lo anterior, no hay evidencia de apoyo que indique que ninguna de ellas tiene un efecto en la medición de los resultados principales de este estudio (que es el intervalo de tiempo de presentación hasta el parto).

Resultados:

Los resultados esperados (basándose en los presentes datos) de una prueba clínica en curso se resumen en la Tabla 2 que se da a continuación:

25 **Tabla 2: Resultados esperados de la prueba clínica**

TTD (días)	NVP (%) (CI* del 95%)	PPV (%) (CI* del 95%)	SN (%) (CI* del 95%)	SP (%) (CI* del 95%)
≤ 2	100,0 (0,954; 1,00)	45,5 (0,244; 0,678)	100,0 (0,692; 1,00)	86,7 (0,779; 0,929)
≤ 7	97,4 (0,910; 0,997)	81,8 (0,597; 0,948)	90,0 (0,683; 0,988)	95,0 (0,877; 0,986)
≤ 14	93,6 (0,857; 0,979)	90,9 (0,708; 0,988)	80,0 (0,593; 0,932)	97,3 (0,907; 0,997)

Leyenda de la tabla: ‘TTD’: tiempo hasta el parto; ‘SN’: sensibilidad; ‘SP’: especificidad; ‘NPV’: valor predictivo negativo; ‘PPV’: valor predictivo positivo; intervalos de confianza (CI) del 95%, computados por medio del procedimiento de Clopper-Pearson.

Resultados finales de la prueba clínica completada

30 En la prueba clínica, 101 mujeres con embarazos individuales de entre 20^{0/7} y 36^{6/7} semanas de gestación, que presentaban signos, síntomas o molestias por ellas referidos que sugerían parto prematuro, incluidas contracciones del útero, con o sin dolor, dolor intermitente en el abdomen bajo y presión pélvica, fueron evaluadas en todo el curso del estudio. Las pacientes inscritas tenían membranas amnióticas intactas según se determinó mediante examen con espéculo, así como una mínima dilatación cervical (≤ 3 cm). Se llevó a cabo un examen clínico completo por el profesional médico a cargo, incluyendo la recogida de la muestra de ensayo de TTD según se ha descrito en el Ejemplo 1 anterior. Los parámetros registrados en la presentación incluían la longitud cervical, la dilatación cervical, la frecuencia de las contracciones, el estado de la membrana, el borrado cervical, el historial de la paciente y el resultado de la prueba con el conjunto de prueba de TTD (TTD Test Kit). Las pacientes con rotura abierta de las membranas fetales, diagnosticada como pérdida de fluido observada desde el os cervical durante el examen con espéculo estéril, no se incorporaron al estudio. La edad media era 28 años (intervalo de 18 a 43 años), y el tiempo de gestación medio en la presentación era 31,4 semanas (intervalo entre 22,4 y 36,5 semanas). No se incluyeron gestaciones múltiples en la prueba.

40 Se recogió la muestra para la prueba de TTD y se llevó a cabo el procedimiento de ensayo de TTD según se ha descrito en el Ejemplo 1 anterior. Los resultados se interpretaron una vez que fueron visibles dos líneas, o bien una vez transcurridos cinco minutos tras la inserción de la tira de ensayo dentro del vial de muestra. Se informó de los

resultados por la presencia de dos líneas (positivo para PAMG-1) o de una sola línea (negativo para PAMG-1). El profesional médico a cargo no estaba al corriente de los resultados de la prueba de TTD cuando tomó las decisiones con respecto al cuidado de la paciente. Se calcularon la sensibilidad (SN), la especificidad (SP), el valor predictivo positivo (PPV) y el valor predictivo negativo (NPV) del conjunto de prueba de TTD en la predicción del tiempo hasta el parto prematuro espontáneo (dentro de entre 7 y 14 días), a la conclusión de la prueba. Se calcularon intervalos de confianza del 95% utilizando el procedimiento de Clopper-Pearson.

Veinte (20) pacientes dieron a luz dentro de 7 días de presentación, y otras cinco dieron a luz dentro de 14 días de presentación. La prueba de TTD fue positiva en el 23% (23/101) de las pacientes, y el lapso de tiempo medio entre la prueba y el parto, en esta población, fue 3,86 días, en comparación con los 32,12 días para el grupo que dio negativo en la prueba de TTD. La Tabla 3 que se da a continuación resume los resultados de la prueba de TTD para un alumbramiento entre 7 y 14 días, respectivamente.

Tabla 3: Resultados de la prueba de TTD

		Alumbramiento en ≤ 7 días (nº de pacientes)		Alumbramiento en ≤ 14 días (nº de pacientes)	
		+	-	+	-
Resultados de la prueba de TTD	+	18	5	20	3
	-	2	76	5	73

El NPV, PPV, SN y SP para la prueba de TTD que confirmaban el parto prematuro espontáneo dentro de 7 y de 14 días desde la presentación se resumen en la Tabla 4 que se da a continuación:

Tabla 4: NPV, PPV, SN y SP de la prueba de TTD

TTD (días)	NVP (CI* del 95%)	PPV (CI* del 95%)	SN (CI* del 95%)	SP (CI* del 95%)
≤ 7	97,4% (91,0 - 99,7%)	78,3% (56,3 - 92,5%)	90,0% (68,3 - 98,8%)	93,8% (86,2 - 98%)
≤ 14	93,6% (85,7 - 97,9%)	87,0% (66,4 - 97,2%)	80,0% (59,3 - 93,2%)	96,1% (88,9 - 99,2%)

Leyenda de la tabla: 'TTD': tiempo hasta el parto; 'SN': sensibilidad; 'SP': especificidad; 'NPV': valor predictivo negativo; 'PPV': valor predictivo positivo; intervalos de confianza (CI) del 95%, computados por medio del procedimiento de Clopper-Pearson.

Los resultados finales de NPV, PPV, SN y SP para la prueba de TTD para un parto dentro de 48 horas (≤ 2 días) fueron los mismos que los resultados esperados expuestos en la Tabla 2 anterior.

La incidencia de una prueba de TTD positiva fue también desglosada en diferentes intervalos de semanas de tiempo de gestación. Los resultados se resumen en la Tabla 5, a continuación:

Tabla 5: Incidencia positiva de la prueba de TTD y comportamiento por tiempo de gestación

Intervalo de semanas de tiempo de gestación (inclusivo)	Total	Incidencia positiva de la prueba de TTD	Alumbramiento ≤ 7 días			
			SN	SP	PPV	NPV
22 - 25	6	0,0%	N/A	100,0%	N/A	100,0%
26-29	31	25,8%	100%	92,0%	75,0%	100,0%
30-33	37	24,3%	100%	90,3%	66,7%	100,0%
34-36	27	22,2%	75%	100,0%	100,0%	90,5%

Leyenda de la tabla: 'TTD': tiempo hasta el parto; 'SN': sensibilidad; 'SP': especificidad; 'NPV': valor predictivo negativo; 'PPV': valor predictivo positivo.

Este ejemplo, incluyendo los datos mostrados en las Tablas 2-5, demostraba que la prueba de TTD proporciona un método para diagnosticar el TTD dentro de 2, 7 o 14 días con elevados SN, SP, NPV y PPV. Se demostró que la prueba de TTD puede ser utilizada para descartar el alumbramiento prematuro espontáneo dentro de 2, 7 y 14 días en pacientes con amenaza de parto prematuro. Una prueba de TTD positiva en pacientes que presentaban síntomas de parto prematuro, membranas intactas y una dilatación cervical mínima (≤ 3 cm), indicaba que se produciría un parto prematuro espontáneo dentro de 7 días con un alto grado de precisión. Un resultado negativo, por otra parte, indicaba que el alumbramiento prematuro espontáneo dentro de 14 días era altamente improbable. Los Ejemplos también demuestran que la prueba de TTD tiene elevados PPV, NPV, SN y SP.

Se han descrito diversas realizaciones de la presente invención. Ha de entenderse, de manera adicional, que todos los valores son aproximados y se proporcionan con propósitos de descripción.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para predecir el tiempo hasta el parto (TTD), de manera que el método comprende:
- (a) poner en contacto una muestra de fluido vaginal obtenida de una paciente embarazada con al menos dos anticuerpos monoclonales específicos de PAMG-1, de tal modo que uno de los anticuerpos se enlaza con la PAMG-1, formando un complejo PAMG-1 / anticuerpo monoclonal que se pone entonces en contacto con un segundo anticuerpo monoclonal, inmovilizado, de tal manera que los anticuerpos monoclonales se enlazan simultáneamente a la molécula de PAMG-1;
 - (b) detectar la presencia del complejo PAMG-1 / anticuerpo monoclonal en la muestra únicamente cuando la concentración de PAMG-1 en la muestra excede de un valor de umbral de detección predefinido de 4 ng/ml; y
 - (c) predecir que la mujer embarazada dará a luz dentro del intervalo de tiempo predeterminado si se ha detectado PAMG-1; o
 - (d) predecir que la mujer embarazada no dará a luz dentro del intervalo de tiempo predeterminado si no se ha detectado PAMG-1;
- el cual comprende, adicionalmente:
- (i) signos, síntomas o molestias que sugieren parto prematuro; y
 - (ii) un tiempo de gestación comprendido entre 20 semanas y 36 semanas y 6 días.
- 2.- El método de acuerdo con la reivindicación 1,
- (a) que comprende seleccionar la mujer embarazada para el análisis mediante el método únicamente si la mujer embarazada presenta, adicionalmente, uno o más de los siguientes:
 - (iii) una longitud cervical de 25 mm o más; y
 - (iv) una dilatación cervical de 3 cm o menos; y/o
 - (b) que comprende recoger la muestra de fluido vaginal de la mujer embarazada con un dispositivo de recogida, preferiblemente un hisopo mullido; y/o
 - (c) que comprende recoger la muestra de fluido vaginal durante un periodo de tiempo de aproximadamente 30 segundos, y/o
 - (d) que comprende poner en contacto el dispositivo de recogida con el disolvente durante aproximadamente 30 segundos tras la recogida de la muestra de fluido vaginal; y/o
 - (e) en el cual la muestra de fluido vaginal se pone en contacto con los al menos dos anticuerpos monoclonales específicos de PAMG-1 durante 5 minutos; y/o
 - (f) en el cual los al menos dos anticuerpos monoclonales específicos de PAMG-1 se utilizan en un dispositivo de flujo lateral, preferiblemente de tal modo que el dispositivo de flujo lateral comprende una región de almohadilla y una región de ensayo, de manera que la región de ensayo comprende una región de control; y/o
 - (g) en el cual uno o más de los al menos dos anticuerpos monoclonales específicos de PAMG-1 consisten en un anticuerpo seleccionado de entre el grupo consistente en el M271, producido por el hibridoma N271, depositado con el Depositario de la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM) y con número de ingreso asignado VKPM-93; y el M52, producido por el hibridoma N52, depositado con la VKPM y con número de ingreso asignado VKPM-92; y el M42, producido por el hibridoma N42, depositado con la VKPM y con número de ingreso asignado VKPM-94.
- 3.- El método de acuerdo con la reivindicación 2b, en el cual el hisopo mullido proporciona una dilución de toda PAMG-1 que esté presente en la muestra de fluido vaginal dentro de un intervalo de dilución entre 1:1 y 1:10, preferiblemente en una dilución de 1:4.
- 4.- El método de acuerdo con la reivindicación 2b o la reivindicación 3, que comprende poner en contacto el dispositivo de recogida con un disolvente para liberar la muestra de fluido vaginal recogida.
- 5.- El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual el intervalo de tiempo

predeterminado para predecir el TTD es:

- (i) dentro de 48 horas;
 - (ii) dentro de 7 días; y/o
 - (iii) dentro de 14 días.
- 5 6.- El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de tal manera que el método tiene uno o más de los siguientes valores predictivos positivos (PPVs):
- (i) al menos el 39%, preferiblemente en torno al 45,5%, para la predicción del TTD dentro de 48 horas;
 - (ii) al menos el 64%, preferiblemente en torno al 78%, para la predicción del TTD dentro de 7 días; y
 - (iii) al menos el 77%, preferiblemente en torno al 87%, para la predicción del TTD dentro de 14 días.
- 10 7.- El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de tal manera que el método tiene un valor predictivo negativo (NPV) del 87% o mayor, preferiblemente uno o más de los siguientes NPVs:
- (i) el 100% para la predicción del TTD dentro de 48 horas.
 - (ii) el 97,4% para para la predicción del TTD dentro de 7 días; y
 - (iii) el 93,6% para la predicción del TTD dentro de 14 días.
- 15 8.- El método de acuerdo con la reivindicación 2f, en el que la región de almohadilla del dispositivo de ensayo comprende el primer anticuerpo monoclonal específico de PAMG-1 y la región de ensayo comprende el segundo anticuerpo monoclonal específico de PAMG-1, y en el cual el primer anticuerpo, en la región de almohadilla, es movilizable y el segundo anticuerpo, en la región de ensayo, se encuentra inmovilizado.

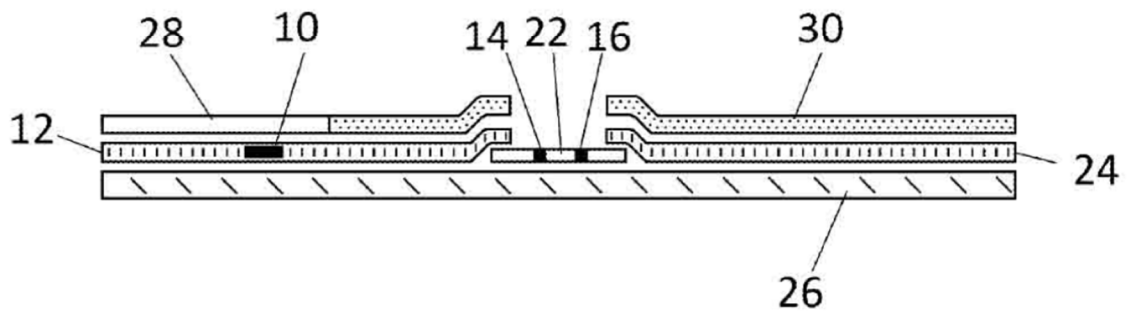


FIG. 1

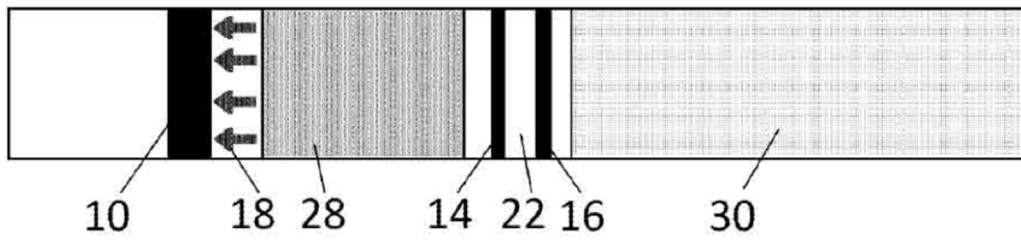


FIG. 2